



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Expresión de anticuerpos recombinantes de un solo dominio de llama (*Lama glama*) y análisis de su capacidad neutralizante de la actividad hemorrágica de una fracción del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo**

AUTOR

Walter Jhon LEIVA DURAN

ASESORES

Dr. Armando YARLEQUÉ CHOCAS

Mg. Henri BAILÓN CALDERÓN (Co-asesor)

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Leiva, W. (2019). *Expresión de anticuerpos recombinantes de un solo dominio de llama (Lama glama) y análisis de su capacidad neutralizante de la actividad hemorrágica de una fracción del veneno de la serpiente Bothrops atrox*. Tesis para optar el título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (opcional):

Código Orcid del asesor o asesores:

Armando Yarleque Chocas

1) 0000-0002-8038-2162

Henri Bailón Calderón

2) 0000-0002-9593-6092

DNI del autor: 47546146

Grupo de Investigación: Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: Instituto Nacional de Salud.

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas.

Localidad:

Av. Prolongación Defensores del Morro 2268, Cercado de Lima 15064, Lima, Perú.

Coordenadas geográficas:

-12.182789,-77.016880

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2017-2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 14:15 horas del 23 de julio de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo de **WALTER JHON LEIVA DURAN**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 008-EPGB-2019, el titulando expuso su tesis: **"EXPRESIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES DE UN SOLO DOMINIO DE LLAMA (*Lama glama*) Y ANÁLISIS DE SU CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE LA ACTIVIDAD HEMORRÁGICA DE UNA FRACCIÓN DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops atrox*"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: Aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo a **WALTER JHON LEIVA DURAN** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 15:15 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 23 de julio de 2019.


Dra. MONICA PAREDES ANAYA
(PRESIDENTA)


Dr. ARMANDO YARLEQUE CHOCAS
(ASESOR)


Dra. FANNY LAZO MANRIQUE
(MIEMBRO)


Mg. EDITH RODRIGUEZ QUISPE
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mi familia, a mi querida hija, a mis amados
padres, a mis hermanos y amigos con los cuales
siempre conté.

AGRADECIMIENTOS

Al Mg. Henri Bailón Calderón, Responsable del Laboratorio de Referencia Nacional de Biotecnología y Biología Molecular, mi maestro; gracias por la oportunidad brindada. A todos los integrantes del laboratorio por ser tan amables y trabajadores les doy las gracias, a Carlos Padilla, Omar Cáceres, Marco Galarza, Juana Choque, Silvia Capristano también gracias a los compañeros de los que aprendí sobre otras áreas de investigación Luis Jaramillo, Andrés, José, Gaby, Verónica, Eva, Cleydi, Astrid, Lizbeth.

Al Dr. Armando Yarlequé Chocas, jefe del Laboratorio de Biología Molecular, asesor, profesor y, con el debido respeto, amigo; gracias por encaminarme rigurosamente en el desarrollo de este trabajo, por los conocimientos brindados, los momentos de compartir que me hicieron sentir bienvenido en su laboratorio. A los integrantes del laboratorio que también fueron mis profesores y maestros el Dr. Gustavo Sandoval, la Dra. Fanny Lazo, El Dr. Dan Vivas, La Dra. Edith Rodríguez, a los tesisistas que también son amigos Andrés, Daniel, Lorgio.

A los que ayudaron durante el proceso de realización de este trabajo en diferentes momentos, a Henri y Pamela del laboratorio de Entomología.

Un agradecimiento especial al doctor Cisneros del Laboratorio de Referencia Nacional de Cultivo Celular del INS por la mentoría y su tiempo para explicar didácticamente los métodos de cultivo de células VERO.

ABREVIATURAS

ACD	ácido cítrico dextrosa, anticoagulante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
APS	Persulfato de amônio
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
DHM	Dosis Hemorrágica Mínima
EMEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle
FAB	Fragmento de unión al antígeno, por sus siglas en inglés <i>fragment antigen</i>
FHP	Fracción Hemorrágica Pesada
HCAbs	Anticuerpos de cadena pesada, por sus siglas en inglés <i>Heavy-chain antibody</i>
HEPES	(ácido 4-(2-hidroxyetil)-1-piperazineethanesulfónico)
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa	KiloDaltons
mA	miliamperios
mg	Miligramo
min.	Minutos
mL	Mililitro

mM	Milimolar
Nb	Nanoanticuerpo o anticuerpo de un solo dominio
ng	Nanogramo
nm	Nanometros
OD ₆₀₀	Densidad óptica en la longitud de onda de 600 nm
PBS	Buffer fosfato salino
pH	Potencial de hidrógeno
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
rpm	revoluciones por minuto
SVMP	Metaloproteasa de veneno de serpiente
TAE	Tris-acetato-EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	tetrametiletilendiamino
μL	Microlitro
μg	Microgramo
μM	Micromolar
V	Voltios
VH	Región variable de anticuerpos convencionales
VHH	Región variable de anticuerpos de HCABs

Índice

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	MARCO TEÓRICO.....	5
	II.1) Producción de anticuerpos de un solo dominio	5
	II.2) Llama.....	6
	II.3) Anticuerpo.....	6
	II.4) Anticuerpos de un solo dominio (Nb)	10
	II.4.1) Definición	10
	II.4.2) Historia	10
	II.4.3) Características y estructura	11
	II.4.4) Usos y aplicaciones de los anticuerpos de un solo dominio	19
	II.5) Ofidismo y Salud Pública.....	20
	II.5.1) <i>Bothrops atrox</i> (LINNAEUS, 1758)	20
	II.5.2) Veneno de <i>Bothrops atrox</i>	21
	II.5.3) Hemorragia y metaloproteinasas	22
	II.6) Producción de antiveneno en Perú y alternativas innovadoras	29
	II.7) Sistema de expresión.....	30
	II.7.1) <i>Escherichia coli</i>	31
	II.7.2) Cepa.....	31
	II.7.3) Plásmido	32
	II.8) Ensayos <i>In vitro</i>	35
	II.8.1) Células VERO.....	35
	II.8.2) Citotoxicidad.....	36
	II.8.3) Ensayo con Alamar Blue	36
III.	ANTECEDENTES	38
IV.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
	IV.1) Hipótesis.....	41

IV.2) Objetivos	41
IV.2.1) Objetivos generales	41
IV.2.2) Objetivos específicos	41
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
V.1) Materiales.....	42
V.1.1) Material biológico	42
V.1.2) Equipos	42
V.1.3) Material de laboratorio.....	43
V.2) Métodos.....	45
V.2.1) Expresión anticuerpos de un solo dominio	45
V.2.2) Purificación de anticuerpos de un solo dominio	46
V.2.3) Evaluación de la pureza.....	47
V.3) Purificación parcial de una fracción del veneno de serpiente <i>Bothrops atrox</i> con actividad hemorrágica.....	47
V.3.1) Cromatografía de exclusión molecular	48
V.4) Cuantificación de proteínas	49
V.4.1) Cuantificación por lectura a 280 nm (Warburg y Christian, 1941).....	49
V.4.2) Cuantificación por el método de Bradford (Bradford M., 1976)	49
V.4.3) Cuantificación por Qubit.....	50
V.5) Actividades biológicas del veneno de la serpiente <i>B. atrox</i>	50
V.5.1) Dosis Hemorrágica mínima (DHM).....	50
V.5.2) Neutralización de actividad hemorrágica	50
V.5.3) Dosis Efectiva Media (DE ₅₀)	51
V.6) Actividad sobre caseína	51
V.7) Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad	52
V.8) Neutralización <i>in vitro</i> de citotoxicidad	53
VI. RESULTADOS.....	54

VI.1) Purificación de proteína del veneno de <i>Bothrops atrox</i> por cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex G-100 y actividades biológicas.	54
VI.2) Cuantificación de proteínas	58
VI.3) Expresión y purificación de 18 anticuerpos de un solo dominio	59
VI.4) Tamizaje de neutralización de la actividad hemorrágica.....	61
VI.5) Dosis hemorrágica mínima (DHM)	64
VI.6) Dosis efectiva media (DE ₅₀) de 07 anticuerpos de un solo dominio	64
VI.7) Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i>	66
VII. DISCUSIÓN	68
VIII. CONCLUSIONES.....	77
IX. RECOMENDACIONES.....	78
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
XI. ANEXO	98

RESUMEN

Los anticuerpos de un solo dominio (Nb) de camélidos son producidos biotecnológicamente a partir de los genes que codifican para los anticuerpos de cadena pesada en los linfocitos de camélidos. Estos Nb de camélidos tienen varias ventajas frente a los anticuerpos IgG comunes, como ser muy resistentes a temperaturas altas, bajo pH, ser pequeños, solubles y fáciles de producir de forma recombinante.

Este trabajo se basa en expresar y purificar anticuerpos recombinantes de un solo dominio de llama (*Lama glama*) en *Escherichia coli* y evaluar su capacidad para neutralizar la actividad hemorrágica de una fracción pesada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*, en ratones de laboratorio.

Se analizaron 18 Nb expresados y purificados en *E. coli* para determinar su capacidad neutralizante de la actividad hemorrágica empleando ratones de laboratorio. Para esto se realizó un fraccionamiento del veneno de serpiente *Bothrops atrox* por cromatografía de exclusión molecular sobre resina Sephadex G-100 y se seleccionó una fracción de alto peso molecular con actividad hemorrágica. Se evaluó la dosis hemorrágica mínima (DHM) en el veneno crudo (0.810 µg) y en la fracción (0.433 µg) la cual representó 1.87 veces superior a la del veneno crudo; luego se evaluó la dosis eficaz 50% (DE 50) para cada Nb usando como dosis reto 4 DHM. Se encontró que 6 Nb tienen capacidad neutralizante además uno de ellos tiene una dosis eficaz 50% contra el efecto hemorrágico muy efectivo de 2247 µL de antiveneno/mg de veneno. También se evaluó la neutralización de la citotoxicidad de algunos Nb.

Se concluye que algunos de los anticuerpos recombinantes de un solo dominio de llama (*Lama glama*) obtenidos en este estudio, son capaces de neutralizar la actividad hemorrágica de una fracción del veneno de la serpiente peruana *B. atrox*. Hay Nb que pueden ser usados para la formulación de un antídoto recombinante efectivo y económico.

Palabras clave: *Lama glama*, *Bothrops atrox*, *in vivo*, Dosis efectiva media (DE₅₀), neutralización.

ABSTRACT

Camelid nanobodies, also called single domain antibodies, are biotechnologically produced from the genes encoding the heavy chain antibodies in camelid lymphocytes. These single-domain camelid antibodies have several advantages over common IgG antibodies, such as being very resistant to high temperatures, low pH, being small, soluble and easy to produce biotechnologically.

This work consists of expressing and purifying recombinant antibodies of a single llama domain (*Lama glama*) in *Escherichia coli* and evaluating their ability to neutralize the hemorrhagic activity of a heavy fraction of the venom of the Peruvian snake *Bothrops atrox*, in laboratory mice.

18 nanobodies were analyzed and purified in *E. coli* to determine their neutralizing capacity using mice. For this, a fractionation of the snake venom in Sephadex G-100 molecular exclusion resin was performed and a high molecular weight fraction with hemorrhagic activity was selected. The minimum hemorrhagic dose (DHM) was evaluated in crude venom (0.810 µg) and in the fraction (0.433 µg) which represented 1.87 times higher than the crude venom; then the 50% effective dose (ED 50) was evaluated for each nanobody using 4 DHM challenge as a dose. It was found that 6 nanobodies have a neutralizing capacity and one of them has an effective dose of 50% against the hemorrhagic effect of 2247 µL of antivenom/mg of venom very effective. The neutralization of the cytotoxicity of single-domain antibodies was also evaluated.

It is concluded that there are nanobodies that can be used for the formulation of an effective and economical recombinant antidote.

Key words: *Lama glama*, *Bothrops atrox*, *in vivo*, effective dose 50 (ED50), neutralization

I. INTRODUCCIÓN

Se desconoce el número exacto de mordeduras de serpiente en el mundo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que afecta a unos 5 millones de personas al año y de ellas resultan envenenadas 2.5 millones; también se estima que causan al menos 125 000 muertes al año y la cifra de amputaciones y discapacidades permanentes son tres veces mayores (OMS, 2007). Además, el problema de las mordidas de serpientes podría ser más numeroso de lo que parece, debido a que las mismas estimaciones de la OMS, podrían subestimar los casos totales de las mordidas de serpientes (Fox *et al.*, 2006); esto es a causa de que los datos de incidencia y mortalidad producidos por ofidismos se encuentren sesgados porque la mayoría de estimaciones se realizan a partir únicamente de los registros de los hospitales (Gutiérrez, 2011).

En un reporte del 2007 la OMS describe que América latina (regiones tropicales y subtropicales), es una zona donde se produce gran cantidad de casos de mordidas de serpientes. Además, considerando la gran variedad de serpientes que hay en el Perú, se vuelve un tema de salud pública. Solo en 2 familias, Viperidae y Elapidae, se encuentran 33 especies venenosas (Navarrete *et al.*, 2010) en el Perú, distribuidos en diferentes hábitats a lo largo del territorio. En el Perú se encuentra a *Bothrops atrox* “Jergón” como la serpiente agresora con mayor reporte de mordeduras de serpientes a personas, también tiene la más alta tasa de mortalidad (Navarrete *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2016). Asimismo, el envenenamiento por mordeduras de serpientes peruanas puede producir parálisis grave de los músculos respiratorios, trastornos hemorrágicos, insuficiencia renal irreversible o grave destrucción local de los tejidos que requiere amputación en especial si no se trata a tiempo (Mendoza *et al.*, 2008). Todo esto vuelve al Perú, un país vulnerable a los daños causados por ofidismo. Por ende, la investigación orientada al mejoramiento de la producción de antídotos es muy

importante. En su último informe la OMS presenta un balance de los precios de los antivenenos, mencionando que los precios se han incrementado en los últimos 20 años por la baja demanda por eso es importante tener bien estructurado un sistema de salud a nivel nacional con enfoque en este tema (OMS, actualizado el 2015)

En el Perú la producción de sueros antiofídicos se inicia el 1978 con el médico veterinario Oswaldo Meneses García y hoy en día es producido por el Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) del Instituto Nacional de Salud (INS) (Lévano *et al.*, 2004). Allí, se producen antivenenos botrópicos polivalentes (es decir para una amplia gama de especies de serpientes del genero *Bothrops*) con la finalidad de ser usados para los accidentes de ofidismo. Se ha probado la efectividad de estos antivenenos como inhibidores de las actividades proteolíticas de las proteínas de veneno (Yarlequé *et al.*, 2008, Estevao –Costa *et al.*, 2016) y es usado para casos de ofidismo a lo largo del territorio peruano. La producción de antídotos para los venenos botrópicos actualmente se realiza en equinos debido a la gran cantidad de sangre que se puede extraer de ellos. Primero se realiza una serie de hiperinmunizaciones y luego se obtiene la sangre del equino y se procede a la purificación de las gamma globulinas que se usaran como suero antibotrópico (Lévano *et al.*, 2004). Todo esto requiere de una gran inversión de dinero, tiempo y personal calificado y es por esto que investigaciones orientadas a disminuir la inversión necesaria o a mejorar la calidad de los antídotos es importante.

Los venenos de serpientes son una mezcla de proteínas y polipéptidos (Zelanis *et al.*, 2014) que se produce en glándulas especializadas. La composición de las proteínas y polipéptidos de las serpientes varían de especie a especie incluso de individuo a individuo (Zelanis *et al.*, 2014) y también depende del estado fisiológico del individuo. Por ejemplo la edad, donde se ha observado que individuos jóvenes tienen mayor concentración de proteínas que la de individuos adultos (Málaga *et al.*, 2000, Sousa *et al.*, 2017). Por lo anterior, son importantes las estandarizaciones de las metodologías y

técnicas usadas para obtener el veneno de las serpientes ya que estas son el insumo básico para obtener sueros antiofídicos. Al INS específicamente al CNPB llegan serpientes de todas partes del Perú que son identificadas y clasificadas para obtener de ellas el veneno que se necesita (Lévano *et al.*, 2004), ya que para producir antídotos de buena calidad los venenos que se deben usar para inocular a los caballos también deben ser de buena calidad.

Por otro lado, los Nb de “llama” están adquiriendo gran relevancia estas últimas décadas debido a sus características (Los Nb tienen una mayor penetración en los tejidos que los anticuerpos tradicionales (150 kDa) debido a su menor tamaño (15 kDa); además tienen gran afinidad, estabilidad y alta especificidad, son muy estables y es posible expresarlos heterológicamente en un sistema bacteriano (Fridy *et al.*, 2014)), desde el descubrimiento de que los camélidos producen anticuerpos homodímeros de cadena pesada libres de cadena ligera y son funcionales (Hamers-Casterman *et al.*, 1993, Muyldermans *et al.*, 1994), las investigaciones respecto a esto ha ido creciendo rápidamente. Debido a sus ventajas el uso de Nb en investigación está ampliándose (Detalle *et al.*, 2016; Peyvandi *et al.*, 2016).

Además, la bacteria *Escherichia coli* es en la actualidad uno de los sistemas de expresión heteróloga más usados que presenta ventajas frente a otros, por ejemplo, es uno de los organismos más estudiados en cuanto a su metabolismo, proteínas y en especial a nivel genético, es de fácil manipulación y tiene requerimientos simples de nutrientes que hacen que muchos laboratorios puedan trabajar con esta bacteria. Una de las desventajas es que al ser un organismo procarionte no puede realizar modificaciones postraduccionales que son requisito indispensable en el correcto funcionamiento de una gran cantidad de proteínas de organismos eucariotas (Zhang *et al.*, 2004). Es por esto que frente a la necesidad de mejorar los antídotos, específicamente antibotrópico, y gracias a los avances científicos del estudio de anticuerpos en camélidos aparece una nueva solución biotecnológica que permite la

fabricación de Nb recombinantes con capacidad neutralizante de los efectos tóxicos del veneno de serpiente.

Considerando lo anteriormente expuesto este trabajo busca evaluar la capacidad neutralizante de 18 anticuerpos de un solo dominio recombinantes sobre el efecto hemorrágico de una fracción de veneno de serpiente *B. atrox* con la finalidad de proponer unos candidatos para la formulación de un antídoto más efectivo y económico.

II. MARCO TEÓRICO

II.1) Producción de anticuerpos de un solo dominio

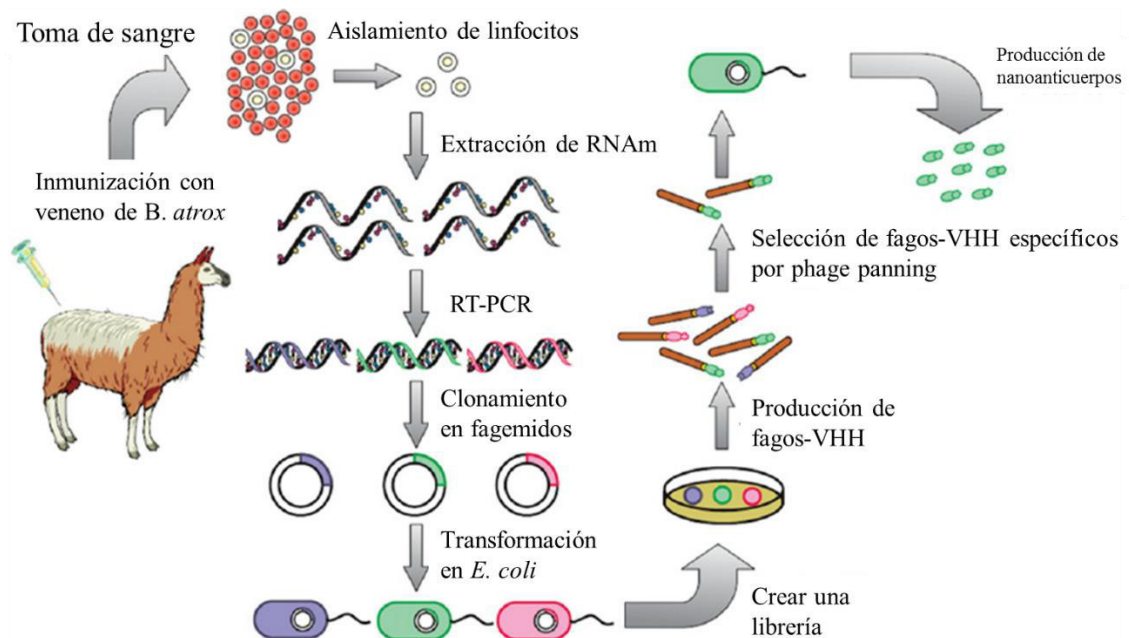


Figura 1. Flujograma de la producción de anticuerpos de un solo dominio o Nb (modificada por Steve Schoonooghe *et al.*, 2012).

La producción de anticuerpos de un solo dominio se realiza empezando por un esquema de inmunización de un camélido (llama). Luego se aíslan linfocitos de la médula o sangre, se extrae el ARNm (ácido ribonucleico mensajero) y se realiza un RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) para amplificar el gen Vhh, el cuál va a ser clonado en un vector y transformado en una cepa de *E. coli* que se va a usar para hacer la librería que luego va a ser expresado en bacteriófagos y seleccionados contra el antígeno específicos, lo bacteriófagos infectarán una cepa de *E. coli* que se va a usar para la producción de anticuerpos de un solo dominio (Steve Schoonooghe *et al.*, 2012).

II.2) Llama

La llama (*Lama glama*) es un mamífero artiodáctilo de la familia Camelidae especie generada a partir de la selección artificial, del guanaco silvestre, por culturas prehispánicas pertenecientes a la región andina de Sudamérica (Perú, Ecuador, Argentina, Chile y Bolivia). Las llamas fueron usadas como animales de carga, para la obtención de carne y lana.

II.3) Anticuerpo

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas propias de los vertebrados y se encuentran en la sangre y son defensas empleadas por el organismo para neutralizar patógenos. Son el componente humoral dentro del sistema inmune adaptativo, que se diferencia del sistema inmune innato porque es capaz de modificarse frente a exposiciones repetidas a un antígeno.

Los anticuerpos están hechos por cadenas pesadas y ligeras, en su estructura se pueden reconocer regiones constantes y regiones variables, estas son las encargadas del reconocimiento y unión a antígenos. El ser humano tiene alrededor de 10^9 - 10^{10} regiones variables distintas en un determinado momento (Fanning *et al.*, 1996), esta variabilidad se debe a factores como la variabilidad de dominios, los dominios variables son regiones dentro de los anticuerpos denominados *complementary determining region* (CDR1, CDR2 y CDR3), la combinación de genes CDRs y otros dominios produce anticuerpos con alta variabilidad; otra causa de la variabilidad es la recombinación V (D) J que produce la variabilidad por recombinación de la región variable. La cadena pesada en su región variable esta codificada en repeticiones en tándem llamadas segmentos variable, diversidad, y acoplamiento (V, D y J; respectivamente), las cuales son ligeramente distintas unas de otras (la cadena ligera solo cuenta con segmentos V y J), esto hace que las combinaciones de una secuencia VDJ sea distinta a otra y logre la formación de anticuerpos de distintas especificidades al antígeno (Market, E. y Papavasiliou, F., 2003); la tercera razón de la variabilidad es la hipermutación somática

y maduración de la afinidad, la cual se da luego de que la presencia de un antígeno produce la proliferación de linfocitos B productores de anticuerpos (plasmocitos), estos aumentan su tasa de mutación puntual en las regiones que expresan los dominios variables (Díaz, M. y Casali, P., 2002), luego los anticuerpos producidos son seleccionados nuevamente (selección clonal) incrementando la cantidad de anticuerpos con alta afinidad; el cambio de la región constante es denominado cambio de clase, en un inicio los linfocitos B vírgenes expresan Inmunoglobulinas de tipo M y D en la superficie celular, después de la activación por un antígeno se cambian las constantes dando lugar a inmunoglobulinas de tipo G, A y E. Esto otorga la facultad de producir distintos isotipos de anticuerpos a partir de un solo linfocito, de esta manera se produce la respuesta adecuada para cada antígeno (Stavnezer, J., y Amemiya, C. T., 2004). Finalmente la cadena ligera y pesada se unen dentro del linfocito B en el retículo endoplasmático para producir el anticuerpo. Además existe una selección negativa en los órganos linfáticos periféricos contra los linfocitos que reconocen antígenos propios del organismo, luego son eliminados por muerte celular programada o apoptosis, los linfocitos que pasan la selección están listos para ser activados y proliferar ante la presencia de un antígeno. Se ha demostrado que en la regulación de esta selección están involucradas proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Do, R. K., 2000)

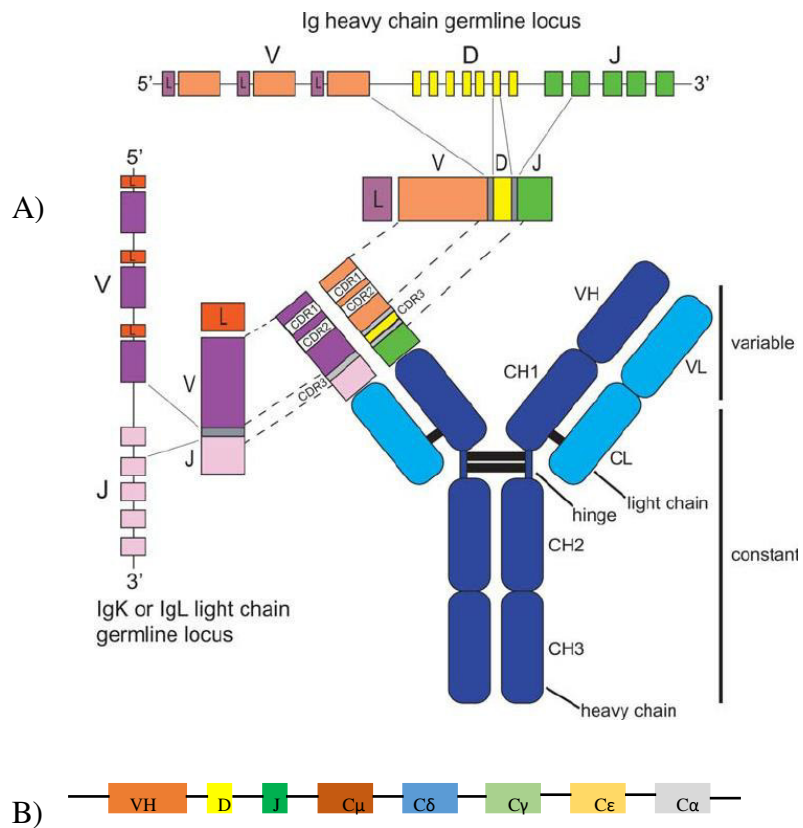


Figura 2. Estructura de un anticuerpo. A) Figura tomada de Flajnik, M. F. 2011, Estructura de una anticuerpos y los cluster VDJ B) Organización de los genes que codifican para la cadena pesada de un anticuerpo convencional.

En los vertebrados los anticuerpos generalmente se encuentran como tetrámeros (un par de dímeros llamados cadenas pesadas y cadenas ligeras), las cadenas pesadas (55 kDa cada una) están conformadas por cuatro dominios, tres dominios constantes y uno variable, las cadenas ligeras (25 kDa cada una) por dos dominios, uno constante y uno variable, además está la región bisagra que permite el movimiento de las regiones variables del anticuerpo (figura 2). Otra forma de agrupar las partes de un anticuerpo es por la funcionalidad que tienen los restos que quedan cuando se realizan cortes enzimáticos: Dos regiones, el fragmento de unión al antígeno (Fab) que se compone de la región variable (VH y VL), un dominio constante (CH y CL) y la bisagra; el fragmento cristalizante (Fc) que se compone de dos dominios constante de la cadena pesada (CH2 y CH3) (figura 2)

Los anticuerpos tradicionales presentan inconvenientes en su aplicación clínica. Debido a su gran tamaño no pueden penetrar a todos los tejidos, a veces son reconocidos como agentes extraños y atacados. Por eso se ha buscado maneras de reducir el tamaño de los anticuerpos (Sandhu, J. S., 1992). Las *Single Chain Variable Fraction* (scFvs) son proteínas recombinantes conformadas por dos regiones variables una de la cadena pesada y una de la cadena ligera ensambladas por un péptido neutro, como se mencionó líneas arriba el Fab es un fragmento de unión al antígeno (Tabla 3). Los scFv y los Fab han sido las propuestas más importantes durante mucho tiempo como un avance en la aplicación terapéutica de los anticuerpos. Sin embargo scFv tiene la desventaja de alterar el plegamiento y reducir la presentación del paratopo que deriva en una menor afinidad a su antígeno. (Borrebaeck, C. A. y Ohlin, M., 2002). Los nanoanticuerpos se descubren en 1989 por Raymond Hamers con un prometedor futuro en aplicaciones clínicas, los trabajos posteriores confirmaron sus características.

II.4) Anticuerpos de un solo dominio (Nb)

II.4.1) Definición

Los anticuerpos de un solo dominio son proteínas derivadas de la región variable (VHH, dominio variable único de las IgG2 e IgG3) de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). Por otro lado, los anticuerpos de cadena pesada (HCAbs del inglés Heavy Chain antibodies) son anticuerpos tipo G de camélidos que no poseen la región CH1 de la cadena pesada y toda la cadena ligera (Tabla 3)

II.4.2) Historia

Hace algunas décadas Raymond Hamers, de la Universidad de Bruselas, en 1989 como parte de un trabajo de fin de carrera, descubrió que los camellos poseen unos anticuerpos especiales que consisten solo de dos cadenas pesadas y carecen de las cadenas ligeras de los anticuerpos IgG normales; y que de estos se pueden derivar anticuerpos más simples de un solo dominio, con características beneficiosas para su aplicación biotecnológica, este trabajo fue publicado posteriormente en 1993 (Hamers-Casterman *et al.*, 1993) en el cual ensayaron la afinidad de anticuerpos presentes en suero de camélidos por proteínas A y G. Obtuvieron dos fracciones de anticuerpos IgGs. Una fracción correspondiente a la IgG1 (170 kDa) que al reducirlo produjo fragmentos pertenecientes a la cadena pesada (50 kDa) y a la cadena ligera (30 kDa). La otra fracción correspondiente a IgG2 e IgG3 (100 kDa) generó dos fragmentos de 46 kDa y 43 kDa lo que hizo pensar a los autores que había una falta de cadena ligera y designarlos como anticuerpos de cadena pesada (HCAbs). Además hallaron que la afinidad por el antígeno se conservó en los tres isotipos observados. Se observó que esto sucede en todos los camélidos, incluida la llama.

Lo mas importante de los HCAbs es la región variable que es un fragmento de aproximadamente 15 kDa que se pliega independientemente de la estructura del anticuerpo y por si solo conserva el poder de acoplarse a su antígeno (Tillib, S. V., 2011). Las múltiples ventajas que presentan las VHH sobre los Fab o los scFv lo vuelven un

candidato prometedor para distintas terapias y usos. Ventajas como fácil difusión por los tejidos, una fabricación rápida y barata de la proteína recombinante en *Escherichia coli*, baja inmunogenicidad, soporta condiciones altas de temperatura y acidez, capacidad de inmunización, y no forma agregados de proteínas como las regiones variables de las Fab y scFv (Tillib, S. V., 2011).

II.4.3) Características y estructura

El potencial terapéutico de los anticuerpos de un solo dominio está tomando mayor importancia en esta última década debido a sus características funcionales (como alta afinidad y especificidad, pequeño tamaño, gran estabilidad) (Könning *et al.*, 2017). Penetran en los tejidos, tienen un incremento de la estabilidad fisicoquímica de la molécula (Ebrahimizadeh *et al.*, 2015). Estructuralmente presentan mayor presencia de residuos de aminoácidos hidrofílicos en la estructura de los dominios VHH esto aumenta su solubilidad en el agua así como su baja tendencia a formar agregados y aumenta su resistencia al calor y al pH (Könning *et al.*, 2017).

Los HCAs se parecen a la cadena pesada de los anticuerpos convencionales (Tabla 3) excepto por la ausencia de la región CH1, la región variable comprende una estructura de 9 hojas beta unidas por *loops* con cambios puntuales pero importantes (Flajnik, M. F., *et al.*, 2011. Figura 3).

Las VHHs similar a las VHs tienen regiones que flanquean a las 3 regiones CDR, estas se denominan *framework* (FR1, FR2, FR3 y FR4) y están implicadas en el reconocimiento del antígeno. Para mantener el plegamiento correcto las VHHs tienen variaciones como mutaciones puntuales y conservadas en la mayoría de camélidos V42F, G49E, L50R y W52G que hacen mas hidrofílica la superficie, a diferencia de VH que presenta una superficie hidrofóbica al no presentar estas mutaciones que le sirven

para interactuar con la región VL de la cadena ligera. Este cambio además evita la formación de agregados proteicos (Figura 3).

La gran afinidad se atribuye a la presencia de los *loops* alargados en los motivos CDR3 de los dominios VHH. La estructura sobresaliente de este lazo permite el acoplamiento de antígenos que a menudo son inalcanzables para anticuerpos convencionales, tales como los dominios de receptores celulares (Maussang *et al.*, 2013. Desmyter *et al.*, 1996. Könning *et al.*, 2017). Los CDR generan flexibilidad en los *loops* que los componen, debido a su gran tamaño, esto desfavorece la energía de unión al antígeno; no obstante Govaert, *et al.*, 2012 observó que la presencia de un puente disulfuro entre el primer y el tercer *loop* produce una cierta rigidez en la estructura, en este trabajo se realizaron mutaciones puntuales de las cisteínas las cuales fueron sustituidas por los 20 aminoácidos y seleccionando las mutaciones que mantuvieran la afinidad por el antígeno, obtuvieron que en todos los casos hubo una reducción de la afinidad por el antígeno además se encontró que el puente disulfuro actúa a nivel del tercer *loop* aumentando la rigidez de la estructura en esta parte y mejorando la fuerza de interacción con el antígeno.

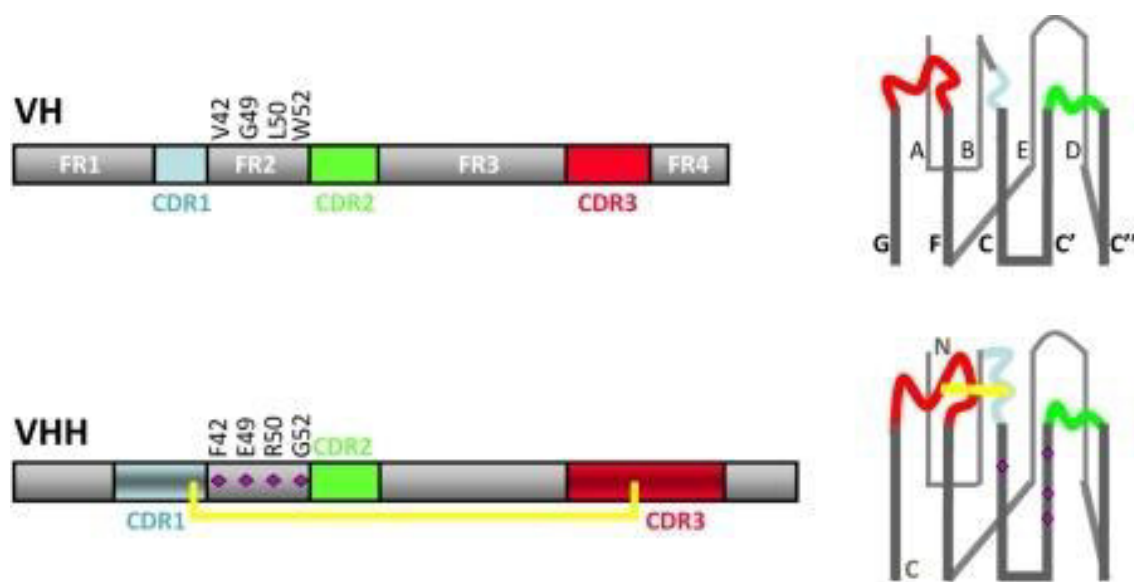


Figura 3. Estructura primaria a la izquierda y plegada a la derecha de la region VH de los anticuerpos convencionales y la región VHH de los anticuerpos de cadena pesada de camélido tomada de Flajnik, M. F., *et al.*, 2011.

Con el avance de las investigaciones surgen los primeros trabajos orientados a mutar regiones VHs de humanos para saber si estas mutaciones pueden permitirles imitar las VHHs. Las primeras mutaciones reportadas las realizaron Davies y Riechmann en 1994 y fueron V42F, V42Y, G49E, L50R y W52G en el FR2 y expresadas en un vector como *E. coli*, produciendo una proteína más estable que tiende a agregarse menos y se puede purificar a una mayor concentración. Por otro lado, trabajos como el de Conrath *et al.*, en el 2005 demuestran que una secuencia VHH (cAbAn33, VHH específico para carbohidrato del centro de una glicoproteína de superficie de *Trypanosoma*) al ser modificada en las posiciones Tyr42Val, Glu49Gly y Arg50Leu para que sean similares a las VHs hace que pierdan solubilidad y afinidad por el antígeno. Aún más logran que vuelvan a tener capacidad de dimerización ante la presencia de una proteína que presente el dominio VL (Conrath *et al.*, 2005), en ese trabajo se propuso que los elementos clave para la solubilidad son Glu49 y Arg50 (Tabla 2).

Los nanoanticuerpos son fáciles de expresar en sistemas como *E. coli*, ya que no dependen de las modificaciones postraduccionales y son pequeños (12-15 kDa). Así mismo, al no ser hidrófobos, los anticuerpos de un solo dominio son resistentes a los cambios de pH y calor. Por otra parte, los fragmentos Fab, scFv y VHH tienen muchas ventajas frente a los anticuerpos tradicionales sin embargo tienen una tasa de vida media de corta duración en la sangre. Sin embargo, los diseños multivalente (dímero y tetrámeros) de los fragmentos Fab, scFv y VHH demostraron una mejor retención a diferencia de los diseños monoméricos, disminuyendo la tasa de disociación de antígenos (Holliger, P., y Hudson, P. J., 2005).

Tabla 1. Diferencias entre los dominios variables de las cadenas pesadas de los anticuerpos convencionales (VH) y los HCAbs (VHH) (Vu, K. B., *et al.*, 1997)

Diferencias	VH	VHH
Posición de la región hipervariable CDR 1	Del aminoácido 31 a 35 muy conservado	Del aminoácido 27 al 35.
Variabilidad de CDR 2 respecto a CDR 1	Mayor	Menor
Promedio de aminoácidos CDR 3	12	17 en Camellos y 6 en llamas.
Puente disulfuro entre el primer y tercer <i>loop</i>.	No se haya en la región variable	Está presente, el puente disulfuro incluso puede estar ubicado en otra regiones por ejemplo entre el tercer <i>loop</i> (cualquier posición) y segundo <i>loop</i> (posición 55); entre FR2 (posición 50) y el tercer <i>loop</i> (cualquier posición). (Vu, K. B., <i>et al.</i> , 1997)

Achour, I. *et al.*, en el 2008 estudiaron las bases genéticas de la producción de anticuerpos homodiméricos de cadena pesada de la alpaca (*Lama pacos*) con la producción de librerías de cósmidos. Mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) en metafase e interfase determinaron que en la región telomérica del brazo largo del cromosoma 4 está el locus IgH donde se encuentran todos los elementos para la generación de los homodímeros de cadena pesada. Analizaron una secuencia que cubría aproximadamente 223 Kb una región V-D-J-C. En esta secuencia se encontró 1 gen VHH y 3 VH, se diferenciaron en la secuencia de aminoácidos de la FR2.

Tabla 2. Diferencia conservadas entre los aminoácidos de los dominios variables de anticuerpos humanos (VH) convencionales y anticuerpos de llama (VHH; Flajnik, M. F., *et al.*, 2011)

Posición del aminoácido	VH	VHH
42	V/I	F/Y
49	G	E/Q
50	L	R
52	W/S	G/F/L

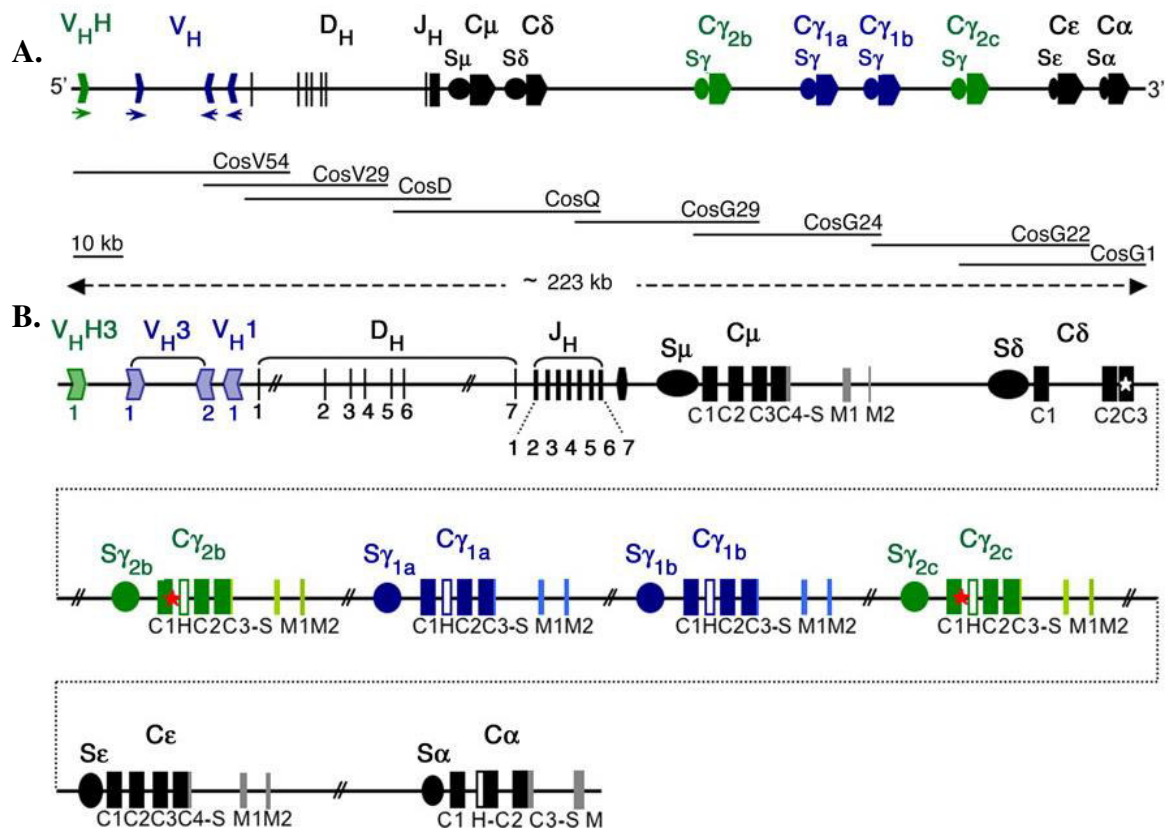
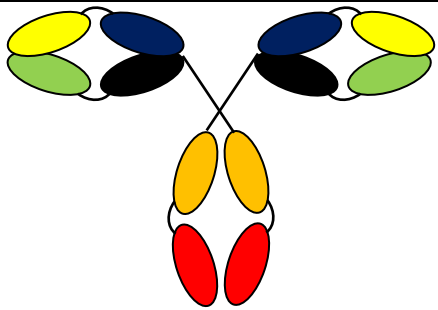
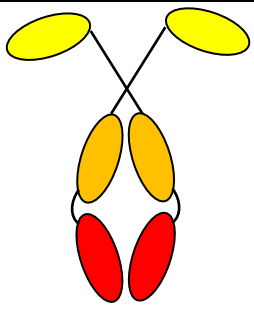
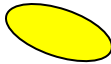




Figura 4. Imagen tomada y modificada de Achour *et al.*, 2008. **A)** Se observa 1 gen VHH y 3 VH que están presentes dentro del constructo secuenciado por Achour *et al.*, (2008) también se observa el cluster D-J que contiene 7 genes D y 7 genes J, siguiéndoles están 8 genes de los dominios constantes que dan lugar a los distintos isotipos. Cμ, Cδ, 4 formas de Cγ, Cε y Cα. De los 4 genes encontrados de Cγ 2 codifican para los homodimeros de cadena pesada (color verde) y 2 codifican para cadenas pesadas de los tetrámeros (color azul), la diferencia entre estos genes es una mutación puntual (G/A) a un lado del sitio de empalme del primer exón CH1. **B)** Detalle de los genes C de camello, se observa que el dominio CH1 (C1 verde) está presente en el gen que codifica para el homodimero de cadena pesada, después de su expresión, su ausencia en el anticuerpo (HCAbs) se debe al empalme por la mutación G/A (estrella roja)

Achour *et al.*, 2008 después de amplificar los genes VH y VHH del genoma de alpaca y un análisis filogenético, encontraron 3 subgrupos diferenciados de genes VH el grupo IgHV1 con 6 genes, IgHV2 con 11 genes y IgHV3 con 71 genes además solo en este subgrupo se encuentran genes VHH estos resultados sugieren que los genes VHH surgen a partir de genes preexistentes VH del subgrupo IgHV3.

Woolven, B. P *et al.*, (1999) mencionaron que debido a una mutación al final del exón CH1 que en genes CH tiene una guanina y en genes CHH tiene un adenina es el motivo por el cual el empalme en HCAs elimina el exón CH1. Sin embargo, trabajos posteriores sugieren que este no es el único factor que produce HCAs, al introducir en ratones una región de DNA híbrida con 2 genes VHH (llama) y los genes DJ y genes de región constante (humana) con la mutación (G/A) al final del exón CH1 estos no produjeron HCAs lo que indica que esta mutación no es la única responsable de la delección del exón CH1 en las HCAs (Zou *et al.*, 2005; Janssens *et al.*, 2006). Woolven, B. P *et al.*, en 1999 proponen que la pérdida del dominio CH1 es importante para evitar la interacción de cadena pesada y cadena ligera que resulta en la producción de anticuerpos homodímeros de cadena pesadas.

Tabla 3. Comparación de anticuerpos IgG normales de mamíferos y de camélidos.

Estructura y dominios			
Denominación	Anticuerpo IgG común (de mamíferos)	Anticuerpo IgG de cadena pesada (de camélidos)	Anticuerpo de un solo dominio (de camélido)
Peso molecular (kDa)	150	60	15
Estructura y dominios			
Denominación	Fragmento de unión al antígeno (Fab)	Fracción variable de cadena simple (scFv)	
Peso molecular (kDa)	60	30	

II.4.4) Usos y aplicaciones de los anticuerpos de un solo dominio

Actualmente se encuentran en proceso de validación varias investigaciones de anticuerpos de un solo dominio para uso humano, como por ejemplo, el dominio VHH anti-virus respiratorio sincytical para el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio bajo, el dominio VHH anti-IL 17-A/F para el tratamiento de psoriasis (Könning *et al.*, 2017; Detalle *et al.*, 2016).

Los anticuerpos tradicionales contra proteínas de estructura cripticas tienen menor eficacia sin embargo en la actualidad trabajos para la producción de dominios de anticuerpos VHH, han permitido crear anticuerpos con buen rendimiento que se acoplan contra proteínas de estructuras cripticas como los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) CXCR4 y CXCR7 (Maussang *et al.*, 2013; Jähnichen *et al.*, 2010)

Un estudio de fase II recientemente completado con la VHH de fusión contra ulvWF (bivalent ultra-large von Willebrand Factor-targeting), llamada caplacizumab, evaluó su idoneidad como tratamiento adyuvante en pacientes que padecen Púrpura Trombótica Trombocitopénica adquirida (TTP). El caplacizumab contrarresta la trombosis microvascular en pacientes con TTP al inhibir la interacción entre multímeros ulvWF y plaquetas y actualmente se encuentra en fase clínica III (Peyvandi *et al.*, 2016) Finalmente, Para poder usarlo clínicamente hay que tener en cuenta la inmunogenicidad potencial que pueda surgir cuando se buscan aplicaciones terapéuticas en humanos; lo cual se puede minimizar al aplicar una estrategia de humanización de los anticuerpos como lo demuestran Vincke *et al.*, 2009.

También se usa en investigación para obtener imágenes microscópicas en los cuales se usan distintas estrategias, los anticuerpos de un solo dominio juegan distintos papeles en estas, donde pueden ser que un anticuerpo primario trabaje en conjunto con anticuerpos secundarios marcados e incluso anticuerpos terciarios marcados por

fluorescencia (De Bruin *et al.*, 2016), análisis de interacción proteína-proteína y exploración de la función de proteínas. (Beghein, E., y Gettemans, J., 2017). Otro uso para los anticuerpos de un solo dominio es que estos son producidos contra proteínas específicas y posteriormente puede añadirseles un marcador fluorescente que le permite a los anticuerpos de un solo dominio mejorar la resolución de las imágenes microscópicas además esto permite ver organelas y partes de células vivas con mejor resolución (Ries *et al.*, 2012).

II.5) Ofidismo y Salud Pública

II.5.1) *Bothrops atrox* (LINNAEUS, 1758)

Reino Animalia

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Clase Reptilia

Orden Squamata

Suborden Serpentes

Familia Viperidae

Subfamilia Crotalinae

Género *Bothrops*

Bothrops atrox

Es una serpiente de la familia Viperidae (llamada jergón) que se distribuye por Sudamérica en zonas tropicales, al este de los andes (específicamente en países como Perú, Colombia, Ecuador, Bolivia, Brasil y Venezuela y otros) su hábitat son generalmente selvas tropicales. Los accidentes ofídicos producidos por esta serpiente

son actualmente un problema de salud pública en el Perú. En la edad adulta llega a medir entre 75 y 125 cm (Campbell, J., 2004)

Tabla 4. Patrón de escamacion de *Bothrops atrox* según el sexo (Campbell, J. 2004).

Escamación	dorsales	ventrales	subcaudales	Cabeza		
				Carenadas intersupraoculares	Sublabiales	supralabiales
Hembra	23-30	177-214	47-72	3-11	7-13	6-9
Macho	23-30	169-214	52-86	3-11	7-13	6-9

La norma del cuerpo de esta serpiente habitualmente consiste de una serie de marcas dorsolaterales que son trapezoidales. Estas marcas suelen variar en toda la línea media, a menudo mezcladas para formar bandas. Los colores de fondo y de las marcas suelen variar también. Comúnmente, la cabeza solo posee una marca que es una franja postocular que va desde detrás del ojo hacia la esquina de los labios.

El promedio de rendimiento del veneno es 124 mg (100 a 150 mg como señala en su trabajo de 1987, Joly *et al.*). En el Perú se encuentra en las regiones de Amazonas, Loreto, San Martín, Ucayali, Huánuco, Pasco, Junín, Ayacucho, Cuzco y Madre de Dios (Loja *et al.*, 2000)

II.5.2) Veneno de *Bothrops atrox*

La ponzoña de *Bothrops atrox* ha sido ampliamente estudiado, Kohlhoff *et al.*, 2012, trabajaron en venenos de *Bothrops atrox*, *B. barnetti* y *B. pictus* para identificar, mediante la técnica PMF (peptide mass fingerprint) las proteínas que contenían y determinaron las proporciones de las proteínas presentes, se identificaron alrededor de 20-25 proteínas pertenecientes a sólo 6-7 familias de proteínas. Las metaloproteinasas de las clases PI y P-III fueron las proteínas más abundantes en todos los venenos (58-74%), seguido de un homólogo de fosfolipasa A2 (6.4-14%), desintegrinas (3.2-9%) y

serina proteinasas (7-11%), además algunas de estas proteínas se presentaron en varias isoformas.

II.5.3) Hemorragia y metaloproteinasas

La hemorragia es uno de los efectos biológicos del veneno de serpiente, este contiene una variedad de proteínas entre ellas un grupo importante son las metaloproteinasas (SVMPs), que al ser aisladas y estudiadas fueron diferenciadas por ser dependientes del zinc (Giron *et al.*, 2008).

Los miembros de la clase PIII (50-65 kDa) están compuestos por tres dominios: el dominio proteolítico, el dominio similar a desintegrina y el dominio rico en cisteína. La clase P-III es la SVMP más hemorrágica y se ha demostrado que inhibe la agregación de plaquetas inducida por colágeno (Zigrino *et al.*, 2002, Baldo *et al.*, 2008)

En contraste con el dominio de desintegrina del grupo PII, los dominios similares a desintegrina PIII no se encuentran libres en el veneno de *B. atrox*. Por otro lado, la hidrólisis de los miembros de la clase PIII conduce a la producción de fragmentos que contienen los dominios similares a desintegrina junto a los dominios ricos en cisteína (Selistre-de-Araújo *et al.*, 2005, Ramos *et al.*, 2006).

Varios estudios reportan que tanto proteínas nativas como recombinantes del dominio de desintegrina o dominio similar a desintegrina unido a parte del dominio rico en cisteína de SVMP P-III muestran una potente actividad antiagregante de plaquetas inducida por colágeno (Higuchi *et al.*, 2011, Suntravat *et al.*, 2016).

Por otro lado, los enlaces disulfuro dentro de las SVMPs son importantes porque a nivel de las modificaciones postraduccionales permiten o evitan una serie de modificaciones que contribuyen a aumentar la complejidad del contenido del veneno en vipéridos (Fox, J. W., y Serrano, S. M., 2008) es probable que para el plegado de las proteínas se necesiten chaperonas, estas ya han sido descubiertas y descritas en venenos de vipéridos (Rioux *et al.*, 1998).

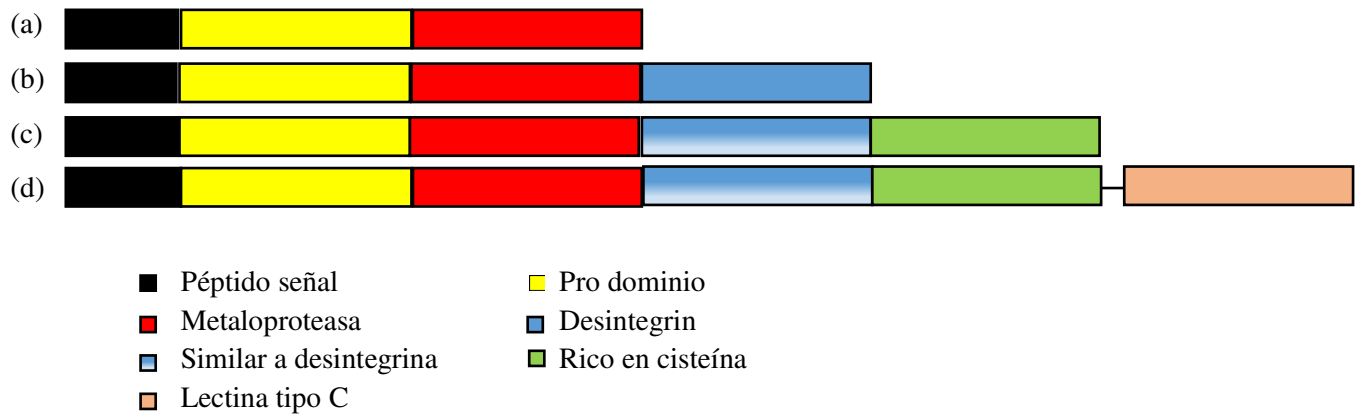
En 2005 Fox, J. W., y Serrano, S. M. desarrollan una revisión en la cual presentan un breve esbozo de la clasificación de las metaloproteasas con los antecedentes hasta ese momento. Proponían también aquí la división en 4 clases de metaloproteasas (I-IV) sin embargo más adelante conforme las categorías fueron revaluadas, se postuló solamente 3 grupos, esta diferencia en la clasificación se debió, esencialmente, a la ausencia o presencia de diversos RNAm y las proteínas aisladas en el veneno donde el grupo IV de la anterior clasificación paso a ser PIIId (Fox, J. W., y Serrano, S. M., 2008) debido a la posibilidad que el grupo IV estructuralmente solo sea una modificación del grupo III. Además, ya en 1963 Satake *et al.*, reconoció que algunas de estas metaloproteinasas de veneno eran inhibidas por EDTA

Las SVMP están divididas en tres clases de acuerdo a la extensión de sus dominios estructurales (Fox, J. W., y Serrano, S. M., 2008)

Tabla 5. Dominios de las metaloproteasa de vipéridos.

Dominio	Función
Proteinasa	Degradación de proteínas
Desintegrina/Similar a desintegrina	Inhibición de la agregación plaquetaria
Rico en cisteína	Unión a integrina por la presencia de motivos de unión

A)



B)

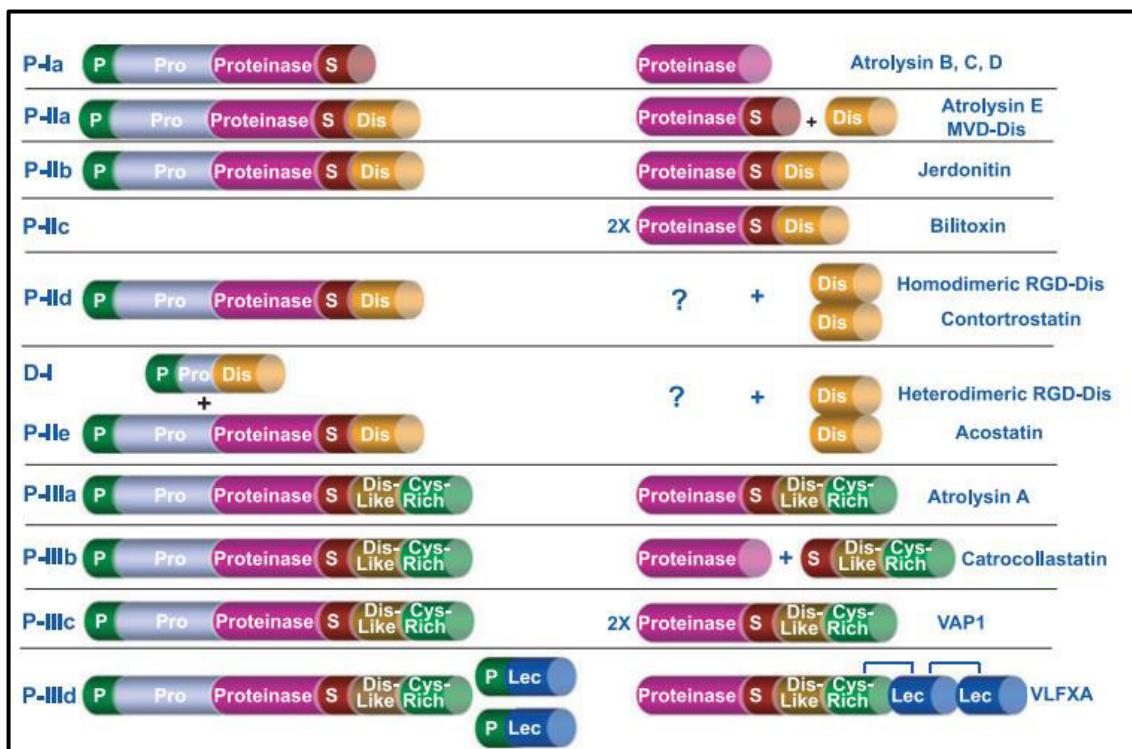


Figura 5. Estructura de las metaloproteinasas **A)** Infografía de la clasificación de metaloproteinasas, modificado de Ramos *et al.*, 2006; **B)** Infografía de la más reciente propuesta de clasificación a partir de datos genómicos y proteómicos, en la columna de la izquierda se encuentra la proteína naciente y en la columna de la derecha la proteína funcional con las modificaciones postraduccionales. Tomada de Fox, J. W., y Serrano, S. M., 2008.

Tabla 6. Comparación y características de los grupos de metaloproteasas descritos en vipéridos (Fox, J. W., y Serrano, S. M., 2008).

		Actividades biológicas	Características
(a)	Metaloproteasa tipo I	Hemorrágica, apoptótica, mionecrótica, inflamatoria, proteolítica y fibrinolítica.	Los enlaces disulfuro de residuos de cisteína es variable (7-4)
(b)	Metaloproteasa tipo II	Hemorrágica, proteolítica e inhibición de la agregación plaquetaria	Presenta en dominio desintegrina que después del procesamiento generalmente está separado del dominio proteasa
(c)	Metaloproteasa tipo III	Hemorrágica, inhibición de la agregación plaquetaria y apoptótica, activación de protrombina.	Presenta el dominio similar a desintegrina y rico en cisteína (se ha observado que estos dos no se encuentran separado en el veneno)
(d)	Metaloproteasa tipo IIIId	Activación del factor X	Contiene dominios lectinas unidos por enlaces disulfuro (anteriormente grupo SVMP IV), análisis transcriptómicos no evidencian un precursor para esta proteína por lo cual es probable que sea una modificación postraducciona a la estructura de una SVMP III Una variación postraducciona de SVMP III antes considerada un grupo aparte (SVMP IV)

II.5.3.1) Biosíntesis y filogenética

La metaloproteinasas son miembros de una familia de genes multilocus que codifican una diversidad funcional y estructural de proteínas responsables de alterar la hemostasia. En los vipéridos la diversificación de las metaloproteinasas es importante para entender su variabilidad, esa diversificación es resultado de la duplicación de genes y variación de genes como SVMPs P-III (Wagstaff, S., y Harrison, R., 2006). Además, se descubrió mediante el secuenciamiento de cDNA que las metaloproteasas se sintetizan primero como precursores latentes que van a ser clivados para activarse (Hite *et al.*, 1992; Shimokawa *et al.*, 1997). El análisis de cDNA muestra la presencia de secuencia señales en todas las proteínas de veneno para la secreción, Además es probable que en el retículo endoplasmático se den las modificaciones postraduccionales (Fox, J. W., y Serrano, S. M., 2008). Adicionalmente, estudios han sugerido que el pH ácido de la luz de la glándula del veneno y los tripéptidos que contienen pirol-glutamato, contribuyen a la falta de actividad proteolítica de las SVMP en la glándula. (Fox, J. W., y Serrano, S. M., 2008).

Por otro lado, la glicosilación es la principal modificación postraducciona en los vipéridos, tiene lugar principalmente en las metaloproteasas y las serinoproteasas (Andrade-Silva, D *et al.*, 2018). Recientemente se ha encontrado que en el complejo jararacá (*B. jararacá*, *B. insularis* y *B. alcatraz*) hay una abundancia relativa de la estructura N-glicosilación con alto contenido de manosa, lo cual sugiere un rol importante de este tipo de N-glicosilación en el plegado y control de calidad en el retículo endoplasmático. (Jitsuhara *et al.*, 2002, Andrade-Silva *et al.*, 2018). Además la glicosilación es útil para aumentar la solubilidad de las proteínas dentro de las glándulas de las serpientes (Fox, J. W., y Serrano, S. M., 2008), protección ante otras metaloproteasas, adhesión y migración. Recientemente se ha encontrado que en el complejo jararacá (*B. jararacá*, *B. insularis* y *B. alcatraz*) hay una abundancia relativa de la estructura N-glicosilación del tipo alta manosa (con alto contenido de manosa), lo cual

sugiere un rol importante de este tipo de N-glicosilación en el plegado (actuando como chaperona) y control de calidad en el retículo endoplasmático. (Jitsuhara, Y. *et al.*, 2002). En el trabajo de nikai *et al.* del 2000 se muestra como al hacer interactuar neuramidasa (una proteína con capacidad de unirse al ácido siálico) con el ácido siálico (monosacárido ácido) ubicado en la parte final de una metaloproteasa, bilitoxina 1, de *Agkistrodon bilineatus* se inhibe la acción hemorrágica de la metaloproteasa bilitoxina 1 y se reduce un 75% su actividad hemorrágica, sugiriendo una gran importancia de esta N-glicosilación para su función.

Las metaloproteinasas de veneno de serpiente están relacionadas a las proteínas ADAM y ADAM-TS que son metaloproteinasas. (Fry, B., 2015). La estructura de los dominios conservados mostrados en la Figura 6 soporta que las SVMP y las proteínas ADAM tienen un pasado evolutivo común. (Fry, B., 2015). Trabajos realizados muestran que los dominios prodominio y metaloproteinasa se encuentran muy conservados en todos los grupos sin embargo los dominios similar a desintegrina, rico en cisteína, similar al factor de crecimiento epidermal, transmembrana, citoplasmático y el motivo trombospondina son poco conservados. En la figura 6 se puede observar que las proteínas ADAM y las SVMP tienen un ancestro común. También se puede evidenciar que las SVMPs se muestran como un grupo monofilético lo que soporta que probablemente la divergencia de este grupo de proteínas, de veneno de serpiente, se debió a un único evento evolutivo (Casewell *et al.*, 2012). En base a la evidencia encontrada Casewell, N. *et al.* en el 2012 hipotetiza que el ancestro común de SVMP y ADAM era una especie predispuesta a la truncación de genes debido a la historia evolutiva de las toxinas SVMPs surge principalmente por la pérdida de dominios. Adicionalmente, la figura 6 muestra que las subclases de SVMP P-IIIb y P-IIIc son grupos monofiléticos independientes lo que según Fry, B., 2015 sugiere que las modificaciones postraduccionales han evolucionado solo 1 vez en cada caso. Se han encontrado que metaloproteinasas tipo III en algunos casos no tienen actividad

hemorrágica sin embargo si tienen otra funciones como activadores de protrombina y actividad fibrinolítica (Leonardi *et al.*, 2007; Loria *et al.*, 2003). Inclusive las SVMP P-III tienen actividad procoagulante mediante su capacidad de activar el factor X. La combinación de la capacidad procoagulante y hemorrágica de esta aumenta ampliamente la severidad de los casos de ofidismo.

1)

	SP						
ADAM-TS	Pro	Metalloproteinase	Dis-like	Cys-rich	Thrombospondin motifs		
ADAM	Pro	Metalloproteinase	Dis-like	Cys-rich	EGF-like	TM	Cyto
P-III SVMP	Pro	Metalloproteinase	Dis-like	Cys-rich			
P-II SVMP	Pro	Metalloproteinase	Dis				
P-I SVMP	Pro	Metalloproteinase					

2)

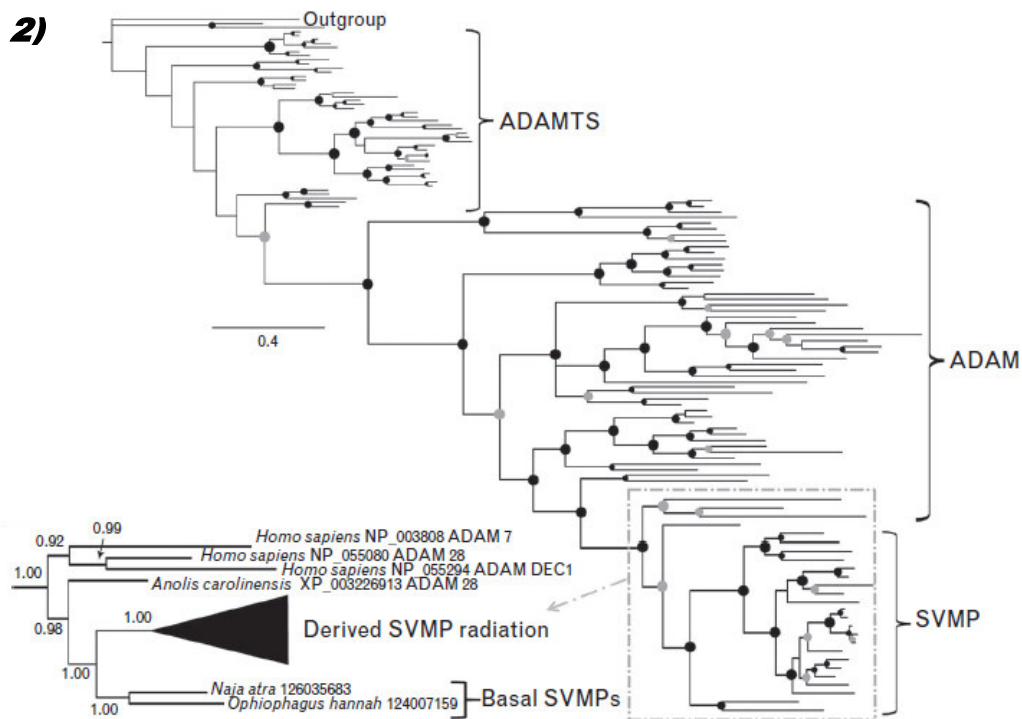


Figura 6. Filogenia de las metaloproteinasas **1)** SVMPs y proteínas ADAMs. **2)** Arbol filogenético en base a las secuencias de SVMPs y las proteínas ADAM y ADAM-TS. **SP:** péptido señal, **Pro:** prodominio, **Dis:** desintegrina, **Cys:** dominio rico en cisteína, **EGF-like:** dominio similar a factor de crecimiento epidermal, **TM:** dominio transmembrana y **Cyto:** dominio citoplasmático. Tomada de Fry, B. (2015).

II.6) Producción de antiveneno en Perú y alternativas innovadoras

El único tratamiento eficaz contra el ofidismo son los sueros hiperinmunes, actualmente en el Perú se realiza la producción de estos sueros hiperinmunes en equinos en el Instituto Nacional de Salud (INS). A cada equino se le somete a inmunizaciones sucesivas, del veneno, cada 8 días durante 3 meses, con inyecciones subletales en dosis crecientes por la vía subcutánea, luego se realiza una sangría exploratoria para determinar el nivel de anticuerpos neutralizantes, si el título y la potencia son adecuados, se procede a realizar sangrías en bolsas estériles especiales empleando anticoagulante con citrato, luego se separan los glóbulos rojos del plasma que contienen las gammaglobulinas de equino (los glóbulos rojos son devueltos al equino) que finalmente pasa por procesos de precipitación, purificación y filtración para que pueda ser usado como antiveneno (Levano S. y Fernandez V. *et al.*, 2004), además el INS recomienda que el antiveneno se aplique antes de las 6 horas y generalmente debe usarse antibióticos por las posibles complicaciones de bacterias o tétano. Recientemente, se han reportado alternativas a la actual forma de producción de antivenenos botrópicos para reducir los costos y efectividad (Mendoza *et al.*, 2012), quienes desarrollaron un protocolo de inmunización aviar para producir inmunoglobulinas gamma (Igy) en huevos de aves. Los ensayos de reacción cruzada entre el veneno y las inmunoglobulinas IgY fueron realizados mediante Western Blot y los resultados fueron alentadores al mostrar una capacidad neutralizante de las inmunoglobulinas Igy purificadas. (Mendoza *et al.*, 2012). Otro trabajo orientado a mejorar la producción de antidotos, fue determinando los epítomos de atroxlisina-I, mediante la técnica de síntesis de SPOT, se han identificado 2 epítomos. Estos han servido para la producción de un péptido sintético (atroxlisina biepitopo) que se usó para inmunizar a ratones BALB/c para obtener un suero antiatroxlisina biepitopo, que luego se evaluó mediante un Western Blot y reacción cruzada de suero contra atroxlisina-I y neutralizando su actividad hemorrágica (Schneider *et al.*, 2016), algunos reportes mencionan la posibilidad de que usando estos péptidos sintéticos sería posible aumentar la generación de inmunoterapéuticos.

II.7) Sistema de expresión

En las dos últimas décadas se ha avanzado bastante en el campo de la expresión de proteínas recombinantes, sin embargo todavía quedan problemas por superar, como la poca expresión, la degradación, la agregación, estrés producido por la proteína; la inestabilidad del plásmido (Singha *et al.*, 2017).

En procariotas, uno de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes más habitual es *Escherichia coli*, sin embargo con menos frecuencia también se usan otras bacterias como sistemas de expresión. *E. coli* tiene ventajas en cuanto a producción, tiempo y costo; y en cuanto al cultivo tiene requerimientos simples. No obstante tiene desventajas, estas son que no permiten modificaciones postraduccionales, puede generar acumulación de proteínas y cuerpos de inclusión, contaminación por proteasas, acumulación de endotoxinas y bajo rendimiento para algunas proteínas eucariotas y dificultad para expresar proteínas de alto peso molecular.

En eucariontes los sistemas más usados son levaduras, en este grupo tenemos a *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estos presentan ventajas como permitir la expresión de proteínas intracelulares y extracelulares, alto rendimiento, corto tiempo de expresión, medios de cultivos económicos y principalmente permiten modificaciones postraduccionales. Algunas de sus desventajas son la presencia de hiperglicosilación en algunas proteínas, puede presentarse una glicosilación errada.

II.7.1) *Escherichia coli*

Una especie de bacteria Gram negativa y anaerobia facultativa presente en el intestino grueso de los humanos y otros animales, a veces patógena.

II.7.2) Cepa

II.7.2.1) *Escherichia coli* WK6 (*Escherichia coli* (ATCC® 47078™))

La cepa WK6 es una cepa del tipo lambda-represor. Es un microorganismo de nivel de bioseguridad 1, y no requiere altos costos de inversión en equipos especiales en bioseguridad.

Genotipo: F' lacIq delta(lacZ)M15 delta(lac-proAB) galE rpsL

lacIq: es una mutación del promotor LacI que incrementa la transcripción y aumenta el nivel de represor lac dentro de la célula (Stetz, M. A *et al.*, 2016) y

delta(lacZ)M15: Es una forma mutante del gen de la β -galactosidasa de *E. coli* en la que se elimina la secuencia que codifica la región N-terminal correspondiente al péptido α . Las cepas de *E. coli* que llevan esta eliminación se usan para probar la complementación.

galE: Expresa la proteína UDP-glucosa 4-epimerasa Participa en el metabolismo de la galactosa. Cataliza la conversión de UDP-galactosa (UDP-Gal) a UDP-glucosa (UDP-Glu) a través de un mecanismo que implica la reducción transitoria de NAD. (Wilson, D. B., y Hogness, D. S., 1964)

Delta(lac-proAB): es la mutación por delección de los genes lac-proAB

rpsL: Con S4 y S5 desempeña un papel importante en la precisión de la traducción. Interactúa y estabiliza las bases del ARNr 16S que participan en la selección del ARNt en el sitio A y con el esqueleto del ARNm. Ubicado en la interfaz de las subunidades 30S y 50S, atraviesa el cuerpo de las subunidades 30S en contacto con las proteínas en el otro lado y, probablemente, mantiene la estructura del ARNr unida.

II.7.3) Plásmido

II.7.3.1) Definición

Es una pequeña molécula de ADN circular independiente del ADN genómico, presente en los procariotas, en cierto grado, del “cromosoma” bacteriano; que comúnmente se usa en la actualidad en el campo de la biotecnología como vector de transformación bacteriana que va a introducir una secuencia foránea de ADN dentro de un sistema de expresión o replicación.

II.7.3.2) Partes del plásmido

II.7.3.2.1) Origen de replicación (ORI)

En los plásmidos es la secuencia de ADN la que va a dar origen a su replicación dentro de *E. coli* (bacterias). El origen de replicación puede brindar diversos niveles de replicación al plásmido lo que puede permitir aumentar el número de copias del gen de interés según el ORI que se use (Bentley *et al.*, 1990)

II.7.3.2.2) Promotor

Inicia la transcripción del inserto. El promotor está diseñado para reclutar la maquinaria transcripcional de un organismo particular o grupo de organismos. Es decir, si un plásmido está destinado para uso en células humanas, el promotor será una secuencia

promotora humana o de mamífero. El promotor también puede dirigir la expresión específica de la célula, que se puede lograr mediante un promotor específico del tejido (por ejemplo, un promotor específico del hígado). La fuerza del promotor también es importante para controlar el nivel de expresión del inserto (es decir, un promotor fuerte dirige la expresión alta, mientras que los promotores más débiles pueden dirigir los niveles de expresión bajos / endógenos).

II.7.3.2.3) Gen de selección: Resistencia a ampicilina

El marcador de selección se utiliza para seleccionar las células que han tomado con éxito el plásmido con el fin de expresar el inserto. El marcador de selección permite la selección de una población de células que han tomado el plásmido y que se pueden usar para estudiar el inserto. El marcador de selección está típicamente presente como gen de resistencia a antibióticos (esta vez, bajo el control de un promotor no bacteriano) o una proteína fluorescente (que se puede usar para seleccionar o clasificar las células por visualización).

La resistencia a ampicilina es ampliamente usada para estos fines. Permite la selección de bacterias que contienen plásmidos proporcionando una ventaja de supervivencia para el huésped bacteriano.

II.7.3.2.4) Sitio de multiclonación (MCS)

Segmento corto de ADN que contiene varios sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, lo que permite una fácil inserción del ADN mediante la digestión y la ligadura de enzimas de restricción. En los plásmidos de expresión, el MCS a menudo se ubica corriente abajo de un promotor, de modo que cuando se inserta un gen dentro del MCS, su expresión será impulsada por el promotor. Como regla general, los sitios de restricción en el MCS son únicos y no están ubicados en ninguna otra parte del

esqueleto del plásmido, por lo que pueden utilizarse para la clonación mediante digestión con enzimas de restricción.

II.7.3.2.5) Inserto

Es el gen, promotor u otro fragmento de ADN clonado en el MCS. El inserto es típicamente el elemento genético que uno desea estudiar utilizando un plásmido particular.

II.7.3.2.6) Sitio de unión a primer

Una secuencia corta de ADN monocatenario utilizada como punto de inicio para la amplificación por PCR o la secuenciación del ADN del plásmido. Los cebadores pueden utilizarse para verificar la secuencia del inserto u otras regiones del plásmido.

II.7.3.3) Vector pHEN6

El vector fagémido pHEN6 es equivalente al vector pHEN4 (Ghahroudi *et al.*, 1997), excepto que la etiqueta de hemaglutinina y el gen III fueron reemplazados por una etiqueta de detección y purificación His6. El gen del anticuerpo de un solo dominio (Vhh) es fusionado a la secuencia señal PelB y a la cola de His-6 en el lado terminal N y C, respectivamente. La cola de histidina es utilizada para la cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, la cola de histidina del anticuerpo de un solo dominio es capturado desde el extracto periplasmático. La secuencia señal PelB sirve para la traslocación al espacio periplasmático y el corte subsecuente de la secuencia señal PelB.

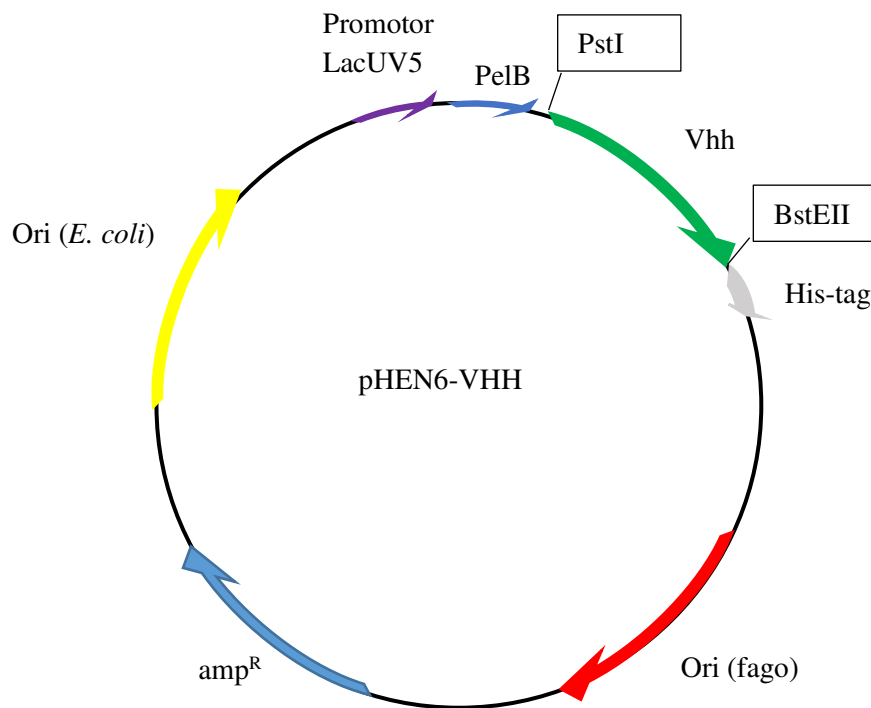


Figura 7. Mapa del vector pHEN6 cargado con el gen VHH

II.8) Ensayos *In vitro*.

II.8.1) Células VERO

Las células Vero son un linaje de células de riñón de mono utilizadas en cultivos celulares. La línea celular Vero se derivó del riñón de un mono verde africano adulto normal (*Chlorocebus* sp.), anteriormente llamado *Cercopithecus aethiops*, este grupo de monos se ha dividido en varias especies) el 27 de marzo de 1962, por Yasumura Y. y Kawakita Y. en la Universidad de Chiba en Japón. La línea celular se llevó al Laboratorio de Virology Tropical de la Universidad de Chiba por el Dr. B. Simizu (15 de junio de 1964). Además de su uso como un sustrato celular de vacuna, esta línea celular se ha

utilizado ampliamente para estudios de replicación de virus y ensayos de placa (Sheets, R., 2000). El linaje de células Vero es continuo y aneuploide, lo que significa que tiene un número anormal de cromosomas. Un linaje celular continuo puede replicarse a través de muchos ciclos de división y no volverse senescente.

II.8.2) Citotoxicidad

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra y la proliferación de células es un indicador vital para comprender los mecanismos de acción de ciertos genes, proteínas y vías que implican la supervivencia o muerte celular después de la exposición a agentes tóxicos. En general, los métodos utilizados para determinar la viabilidad también son comunes para la detección de la proliferación celular.

II.8.3) Ensayo con Alamar Blue

Alamar Blue es un reactivo de ensayo de viabilidad celular que contiene el colorante indicador azul permeable a la célula y soluble en agua, no tóxico y débilmente fluorescente llamado resazurina. Sirve como reactivo en un método basado en la actividad metabólica, diseñado para cuantificar la proliferación de diversas líneas celulares humanas y animales. La resazurina se utiliza como un indicador de óxido-reducción (REDOX) que sufre un cambio colorimétrico en respuesta a la reducción metabólica celular. La forma reducida (resorufina) es rosada y altamente fluorescente, y la intensidad de la fluorescencia producida es proporcional al número de células vivas que respiran. A través de la detección del nivel de oxidación durante la respiración.

II.8.3.1) Absorbancias

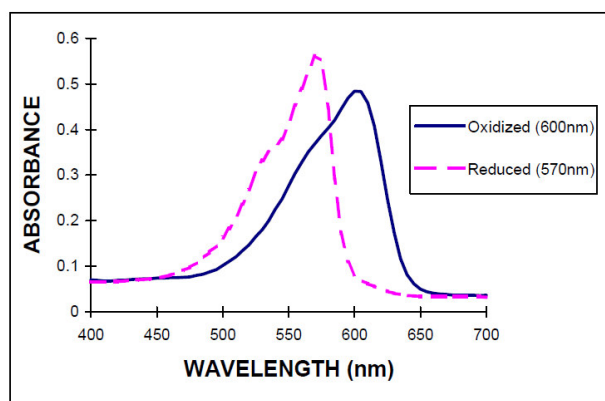


Figura 8. Tomada del manual de uso de alamar Blue (Invitrogen) donde se puede ver el patrón de absorbancia de los estados reducido y oxidado de la resazurina y sus máximos picos de absorbancia.

Se puede usar un método fluorescente o colorimétrico para la lectura del estado del reactivo en este caso usamos el colorimétrico porque contamos con espectrofotómetro. Es soluble en agua y trabaja en suspensiones o líneas celulares fijadas, es estable, no es toxico para las células ni para las personas que lo usan.

III. ANTECEDENTES

El sistema inmune de los camélidos además de los anticuerpos IgG normales cuenta con anticuerpos compuestos únicamente por dos cadenas pesadas (homodímero) (Muyldermans *et al.*, 1994). Estos anticuerpos tienen un solo dominio variable, que puede ser producido de forma recombinante y es denominado anticuerpo de un solo dominio (Nb) o nanoanticuerpo. Los nanoanticuerpos son proteínas recombinantes derivadas de la región variable (VHH) de los anticuerpos de un solo dominio de camélido. Ya se han propuesto metodologías estándar que permiten obtener nanoanticuerpos contra antígenos eficazmente (Fridy *et al.*, 2014).

Fridy *et al.*, 2014 realizaron la producción de nanoanticuerpos diméricos de alta afinidad contra GFP (Green Fluorescent Protein), en su trabajo lograron obtener un buen rendimiento para la expresión de nanoanticuerpos y se brindó una metodología para la producción de estos. Además de este, otros trabajos buscan mejorar el rendimiento de la producción de nanoanticuerpos, y nuevos enfoques proponen crear librerías de genes VHH de camélidos no inmunizados de sangre periférica (Sabir *et al.*, 2014)

En la actualidad existen varios trabajos relacionados a la producción de antivenenos con Nb de camélidos para la neutralización de venenos o toxinas.

Darvish *et al.*, en el 2015 usaron dominios VHH de camélido para producir un antiveneno contra *Hottentotta saulcyi*, un escorpión de importancia en salud pública en Irán. Finalmente encontró un buen candidato que neutraliza el veneno del escorpión, este fue expresado en *Escherichia coli*. Se confirmó la unión a la toxina por transferencia Western Blot. El nanoanticuerpo fue capaz de neutralizar 2 DL50 del veneno total de escorpión. Inclusive un ensayo en ratones donde se inoculó vía intraperitoneal varias concentraciones de veneno luego de 5 minutos se neutralizo con el nanoanticuerpo por vía intravenosa lográndose disminuir los efectos de toxicidad.

Prado *et al.*, en el 2016 ya había expresado Nb de camélidos para neutralizar los efectos miotóxicos del veneno de la serpiente *Bothrops jararacussu*. En ese trabajo purificaron dos fosfolipasas miotóxicas (*Bothropstoxina* I y II) del veneno con los cuales hicieron el biopanning (técnica de selección de proteínas por afinidad), posteriormente en el análisis de las secuencias se encontraron los aminoácidos característicos de la FR2 de VHH en las posiciones: 42F, 49E/Q 50R y 52F/L (Prado *et al.*, 2016) como se habían visto anteriormente en la tabla 2. Pruebas de afinidad, neutralización y Western Blot mostraron 3 nanoanticuerpos funcionales contra *Bothropstoxina* I y 2 contra *Bothropstoxina* II. En el ensayo *in vitro* de reactividad cruzada incluso hubo afinidad de un nanoanticuerpo por la PLA2 de *B. atrox*, y los venenos de *B. Brazili*, *B. diporus*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. matogrossensis*, *B. moojeni*, *B. pauloensis*, *B. pirajai* y *B. urutu*. Adicionalmente a esto se encontró que 2 clones permitían la neutralización del efecto miotóxico en *B. jararacussu* y *B. brazili*, demostrando su capacidad para neutralizar potencialmente a otros venenos del género *Bothrops*.

Los Nb pueden presentar desventajas cuando se trata de usarse contra toxinas, cuando los animales son mordidos por una serpiente venenosa las toxinas tienden a mantenerse en la herida hecha por la mordedura durante un período de tiempo prolongado, y los nanoanticuerpos tienen un tiempo de vida corto en la sangre. Se puede lograr aumentar el tiempo de vida en la sangre de los nanoanticuerpos con PEGilación o construyendo dímeros, trimeros o tetrameros, esto a costa del aumento de tamaño y una posible disminución de propiedades como penetrabilidad a los tejidos.

Siendo así, algunos trabajos han demostrado que los Nb pueden presentar la desventaja de tener un tiempo de vida media corto en el suero, para aumentar el tiempo de vida se puede añadir albúmina a los Nb, además se puede hacer di o tetra formas de los anticuerpos de un solo dominio ((Behdani *et al.*, 2012). Por esta razón, con el objetivo de mejorar los antídotos tradicionales contra escorpión, Yardehnavi *et al.*, (2014) han producido anticuerpos de un solo dominio contra veneno de *Hemiscorpius lepturus* un

escorpión nativo de Irán. En su trabajo se logró desarrollar un anticuerpo de un solo dominio de *Camelus dromedarius* con capacidad de neutralizar el veneno *in vivo*, Además a partir de este estudio Bagheri *et al.*, en el 2017 produjeron un dianticuerpo a partir del mejor candidato, un dianticuerpo es un dímero hecho a partir de un anticuerpo de un solo dominio y encontraron un dianticuerpo que con 500 µg puede neutralizar 4DL50 y dejar una supervivencia 5/6.

Richard *et al.*, 2013 han desarrollado un anticuerpo de un solo dominio de *Lama glama*, con capacidad de neutralizar en escala nanomolar (radio 0.75:1 de anticuerpo:toxina) a la toxina α-cobratoxin, el componente más letal del veneno de *Naja kaouthia*. Además para incrementar el tiempo de vida en el suero de este Nb en ese mismo trabajo se fusionó el Nb a la región Fc de humano, manteniendo su capacidad para neutralizar la α-cobratoxin. Incluso los resultados se mostraron tan prometedores que el 2014 se sacó una patente de estos trabajos en Estados Unidos.

Los autores concluyen que Los VHH identificados podrían ser una herramienta biotecnológica para mejorar el tratamiento del envenenamiento por serpientes, un problema de salud pública mundial importante y descuidado.

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

IV.1) Hipótesis

Los anticuerpos de un solo dominio de llama (*Lama glama*) seleccionados previamente de una fracción con actividad hemorrágica del veneno de la serpiente *B. atrox*; pueden expresarse y producirse de forma recombinante y algunos de ellos pueden neutralizar la actividad hemorrágica del veneno de *B. atrox* en ratones e *in vitro*.

IV.2) Objetivos

IV.2.1) Objetivos generales

Expresar anticuerpos de un solo dominio de *Lama glama* en *E. coli* con capacidad de neutralizar la actividad hemorrágica de una fracción del veneno de serpiente *Bothrops atrox* y neutralizar la citotóxicidad *in vitro* de esta misma fracción del veneno de *Bothrops atrox*.

IV.2.2) Objetivos específicos

- Expresar anticuerpos de un solo dominio contra la fracción pesada de veneno de la serpiente *B. atrox*.
- Purificar parcialmente una fracción del veneno de *B. atrox* con actividad hemorrágica
- Obtener anticuerpos recombinantes de un solo dominio específicos para la fracción del veneno de *Bothrops atrox* con actividad hemorrágica.
- Evaluar la neutralización de la actividad hemorrágica de una fracción del veneno de *B. atrox* con actividad hemorrágica pesada por anticuerpos de un solo dominio, expresados en *E. coli*, de llama (*Lama glama*).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1) Materiales

V.1.1) Material biológico

- Veneno de serpiente liofilizado de *B. atrox*, fue resuspendidos en PBS y almacenados a -80 °C hasta su uso.
- Ratones albinos cepa Balb/c machos de 18-22 g.
- 18 Cepas de *E. coli* WK6 recombinante, conteniendo un fagémido con el gen Vhh de llama (*Lama glama*) codificantes de Nb, seleccionados para una fracción hemorrágica del veneno de *B. atrox*.

V.1.2) Equipos

- Concentrador Speed Vac SC 110 (Savant)
- Cabina de flujo laminar.
- Congeladora -80 °C.
- Fuente de poder para cámara de electroforesis.
- Cámara de electroforesis vertical.
- Foto-documentador Marca BIO-RAD (ChemiDoc XRS).
- Refrigeradora 4 °C.
- Shaker a 37 °C.
- Vórtex.
- Centrifuga refrigerada.
- NanoDrop 8000 de ThermoScientific®
- Cabina de bioseguridad de tipo II.
- Congeladora -80 °C.
- Congeladora -20 °C.
- Foto-documentador Marca BIO-RAD (ChemiDoc XRS).
- Refrigeradora 4 °C.
- Transiluminador.

- Vórtex.
- Cámara para electroforesis PAGE-SDS.
- Autoclave.

V.1.3) Material de laboratorio

- Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL.
- Criobox de 81 pocillos.
- Parafilm.
- Gradillas de plástico
- Micropipetas unicanales de rango variable de 0.5 μ L a 10 μ L; 2 μ L a 20 μ L; 20 μ L a 200 μ L y 100 μ L a 1000 μ L
- Tips con filtro de 10 μ L, 30 μ L, 200 μ L y 1000 μ L.
- Botellas estériles de vidrio 1 L, 500 mL.
- Guantes de nitrilo, mandil, gorra y cubre calzado descartable.
- Probeta de 100 mL
- Tubos Falcon de 50 mL
- Agar 1%
- Etanol 100%
- Buffer de carga (6X)
- Alcohol 70°.
- Hipoclorito de sodio 10%.
- Agua destilada
- Agua MilliQ
- CaCl_2 1 mM (Cloruro de calcio)
- Tris / HCl 20 mM y 200 mM
- HCl 1 M (ácido clorhídrico)
- NaOH 1 M (Hidróxido de sodio)
- Caseína 2%

- PBS Ph 7.4 (Tampón fosfato salino)
- NaCl 1M (Cloruro de sodio)
- Regla y vernier
- Acetato de sodio 0.1 M y 0.05 M
- Carbonato de sodio 0.05 M
- NaCNBH₃ 5 M y 50 mM (Cianoborohidrido de sodio)
- Fosfato de sodio 0.1 M
- Asas de siembra descartable
- Matraces estériles de 500 mL y 2 L.
- Frascos estériles de centrifuga de 250 mL.
- Buffer Tris-glicina
- Ampicilina a 100 mg/mL
- Glucosa al 20%
- Medio LB (luria bertani)
- Medio TB (Terrific Broth)
- MgCl₂ al 2 M
- IPTG (isopropil-B-D-thiogalatosida) al 1 M
- EDTA al 100 mM
- Tris-HCl pH 8.0 al 1 M
- Buffer TES y TES/4 (Shock osmótico)
- Buffer de carga (4X) de proteínas
- Marcador spectra multicolor broad range protein
- Glicerol puro
- Metanol puro
- Ácido acético glacial
- Poliacrilamida
- Tris pH 8.8/6.8

- HEPES 1x (Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfónico)
- SDS 10% (Dodecilsulfato sódico)
- APS 10% (Persulfato amónico)
- TEMED (Tetrametiletilendiamina)
- Resina de Niquel His60 Ni Superflow Resin

V.2) Métodos

V.2.1) Expresión anticuerpos de un solo dominio

V.2.1.1) Preparación del preinóculo

Una alícuota, previamente, criopreservada a -80 °C con glicerol 30 % de *E. coli* WK6 transformada con el gen VHH se atemperó en hielo y se vertió 50 µL en una placa LB agar (Luria-Bertani agar) suplementada con ampicilina (100 µg/mL) y glucosa (2 %), se estrió y se dejó incubando a 37 °C toda la noche. El preinóculo se preparó bajo condiciones estériles, se cogió en un frasco 15 mL de caldo LB (Luria-Bertani), se adicionó 15 µL de ampicilina (100 mg/mL) y se inoculó una colonia aislada desde la placa. Se dejó crecer el cultivo toda la noche a 37 °C y 200 rpm en una incubadora con agitador. Se usó dos matraces de 2 L cada uno, a los cuales se les puso 500 mL de medio TB (Terrific Broth) y se suplementó con 500 µL de ampicilina 100 mg/mL (concentración final 100 µg/mL), 2.5 mL de Glucosa al 20 % (concentración final 0.1 %) y 500 µL de MgCl₂ 2 M (concentración final 2 mM MgCl₂ ; Figura A2, anexo).

V.2.1.2) Crecimiento e inducción de la expresión

Se inoculó 2 mL del preinóculo por cada 500 mL de medio TB suplementado, se dejó crecer a 37 °C y 200 rpm hasta obtener una OD₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm) entre 0.6-0.9 en un incubador con agitación. Se adicionó 500µL de IPTG 1 M por cada matraz que

contiene 500 mL de medio TB (concentración final 1 mM de IPTG). Se incubó toda la noche en agitación a 200 rpm a 28 °C en un agitador (Figura A2, anexo).

V.2.1.3) Cosecha

Después de la inducción toda la noche, se midió la turbidez (los valores oscilaron entre 20 y 30 de OD₆₀₀). El contenido de los matraces se cosechó en tubos de centrifuga de 250 mL a 4000 rpm por 30 minutos a 14 °C (Figura A2, anexo).

V.2.1.4) Preparación del extracto periplasmático

Se resuspendió el pellet celular en buffer TES (Tris, EDTA y Sacarosa) 8 mL de este pellet de 500 mL de cultivo. Se pipeteó hasta lograr una solución homogénea. Se incubó la mezcla por 6 horas en hielo con agitación a 200 rpm en un agitador. Luego, se realizó el shock osmótico añadiendo buffer TES/4.

16 mL de TES/4 por pellet de 500 mL de cultivo. Se pipeteó hasta lograr una solución homogénea. Se incubó luego en un agitador a 200 rpm a 4 °C por toda la noche. Se añadió 150 µl de MgCl₂ 2 M por pellet de 500 mL de cultivo (a una concentración final 10-15 mM de cloruro de magnesio). Se centrifugó por 1 hora a 4000 rpm en una centrifuga a 8 °C. Se transfirió el sobrenadante (el extracto periplasmático) dentro de un tubo de 50 mL sin restos de pellet (Figura A3, anexo).

V.2.2) Purificación de anticuerpos de un solo dominio

V.2.2.1) Preparación de columnas y purificación de anticuerpos de un solo dominio.

El volumen total del extracto periplasmático (aproximadamente entre 50 y 60 mL) se mezcló con 1 mL de resina de níquel (His60 Ni resin, Takara) y se dejó incubar por 2 horas a 25 °C con una agitación de 75 rpm. Luego se armó la columna según las indicaciones del fabricante (columnas *thermo fisher scientific*, 5 mL). Se colocó la mezcla incubada de resina con Nb. Se esperó a que se compacte la resina y antes de que se

acabe de eluir toda la mezcla se agregó buffer HEPES (ácido 4-(2-hidroxyetil)-1-piperazineethanesulfónico) 1 X (20 mL). Luego de pasar este volumen se eluyó la proteína con buffer HEPES 1 X con Imidazol 0.5 M. Se colectaron 10 fracciones de 1 mL cada una. Luego se realizó un tamizaje cualitativo de las eluciones empleando el reactivo de Bradford para identificar las fracciones que contenían proteínas. En una placa de ELISA de 96 pocillos se mezcló 20 µL de muestra de cada fracción colectada con 180 µL de Bradford. Se realizó un pool con las fracciones de anticuerpos de un solo dominio que tienen mayor cantidad de proteína. El pool se dispensó en volúmenes de un 1 mL y se cuantificó la proteína, luego se almacenó a -80 °C (Figura A4, anexo).

V.2.3) Evaluación de la pureza

V.2.3.1) Gel de electroforesis de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS)

Se preparó un gel *resolving* con un 12 o 15 % de poliacrilamida y un gel *stacking* con un 5 % de poliacrilamida de acuerdo a la tabla A2 (anexo). Se ensambló la cámara vertical de electroforesis. La cámara se llenó con buffer Tris-glicina (200 mM Gly, 25 mM Tris, SDS 0.1%) hasta cubrir. Las muestras se calentaron a 100 °C por 5 min (5 µL de buffer de carga 4x, y 15 µL de muestra, aproximadamente 10 µg). Las muestras se depositaron en los carriles y la corrida se realizó a amperaje constante por 15 minutos (50 A), luego se cambió a voltaje constante por 1 h 45 min se coloreó con azul de coomassie R-250 (0.25%). Se decoloró con una solución de metanol 50%, ácido acético 40% por 2 horas hasta la observación de bandas de proteínas.

V.3) Purificación parcial de una fracción del veneno de serpiente *Bothrops atrox* con actividad hemorrágica.

La purificación de proteínas es un procedimiento cuya finalidad es obtener proteínas puras o mezclas menos heterogéneas del cual provengan, para poder realizar ensayos posteriores como la caracterización o evaluar propiedades intrínsecas.

V.3.1) Cromatografía de exclusión molecular

Es un método que se usa para separar moléculas por sus pesos moleculares, para esto se usa una resina porosa (fase estacionaria) y un buffer de corrida (fase líquida), la resina porosa se coloca en una columna, se deja empacar la resina y se coloca la muestra en la parte superior de la columna. Lo que sucede es que la resina tiene poros pequeños y grandes, las muestras que contienen proteínas de distinto tamaño (peso molecular) son separadas porque las proteínas pequeñas pueden pasar por los poros pequeños avanzando más lentamente en la separación, a diferencia de las moléculas grandes que no pueden pasar por estos poros y siguen su camino por los poros grandes o la fase líquida (buffer), finalmente se eluyen fracciones de la muestra que contienen proteínas de diferentes pesos moleculares. En la cromatografía de columna hay que tener en cuenta algunos factores a estandarizar en cada nuevo proceso de purificación como el volumen de resina a usar, el flujo de la fase líquida, el tamaño de la columna, la naturaleza de la fase líquida, la naturaleza de la resina, la naturaleza de la muestra (Coskun, O., 2016). Existen variedad de tipos de resinas (Rojas *et al.*, 2002) que tienen distinta naturaleza bioquímica y se diferencian por el tamaño de poro.

Del veneno liofilizado de *Bothrops atrox* se pesó 500 mg y fueron disueltos en buffer acetato de amonio 0.1 M pH 6.0, previa centrifugación a 3000 rpm para eliminar los restos insolubles. El sobrenadante obtenido fue aplicado a una columna de filtración molecular (25 x 1.5 cm) sobre Sephadex G-100 previamente equilibrada con el mismo buffer.

Se colectaron fracciones de 1 mL a una velocidad de flujo de 10 mL/h monitoreándose la cantidad de proteínas por absorbancia a 280 nm, así como también la actividad hemorrágica (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

La fracción que presentó la mayor actividad hemorrágica fue seleccionada para los ensayos de estimación de Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) y dosis efectiva media (DE₅₀)

V.4) Cuantificación de proteínas

V.4.1) Cuantificación por lectura a 280 nm (Warburg y Christian, 1941)

La absorción ultravioleta a 280 nm se debe principalmente a los aminoácidos tirosina y triptófano (aromáticos) y en menor medida a la fenilalanina y los puentes disulfuro presentes. Este método es el más rápido y se usa generalmente cuando se dan fracciones de proteínas a lo largo de una corrida.

Las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular fueron leídas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm para detección de proteínas. Las fracciones seleccionadas se almacenaron congeladas a -20 °C hasta su uso.

V.4.2) Cuantificación por el método de Bradford (Bradford M., 1976)

Este ensayo es caracterizado por su precisión para la determinación de la concentración de proteínas. El colorante Coomassie G-250 en su forma mas aniónica se une principalmente a aminoácidos de arginina, triptófano, histidina, tirosina y fenilalanina; esto da una coloración azul que absorbe a 590 nm.

Se generó una curva patrón de albúmina (Figura 11). En placas de 96 pocillos se mezclaron 20 µL de muestra y 180 µL del reactivo de Bradford, cada ensayo por duplicado. Se dejó incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos y luego se realizó la lectura a 595 nm en un espectrofotómetro. Se usaron 4 concentraciones de BSA para la curva patrón. Se preparó un blanco que solo contenía buffer acetato de amonio 0.1 M a pH 6.0.

V.4.3) Cuantificación por Qubit

Es un método fluorométrico. Se siguieron las indicaciones del fabricante, en resumen se mezcló el reactivo fluoróforo con su buffer (1:200) y de esa mezcla se cogió 190 μ L y con 10 μ L de muestra se dejó incubar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego fue medido en el Qubit.

V.5) Actividades biológicas del veneno de la serpiente *B. atrox*.

V.5.1) Dosis Hemorrágica mínima (DHM)

Se evaluó la actividad hemorrágica inoculando por vía intradérmica 0.1 mL de veneno crudo y de la fracción hemorrágica pesada (FHP, pág. 54) a ratones albinos cepas Balb/c (20-22g), siguiendo el método de Kondo *et al.*, (1960) modificado por Lomonte *et al.*, (1982). Luego de dos horas, los ratones fueron sacrificados, determinándose el área hemorrágica formada, para lo cual se midió el diámetro mayor de cada área (4 repeticiones por grupo). La dosis mínima hemorrágica (DHM) corresponde a la cantidad de muestra que produce un halo hemorrágico de área de 10 mm de diámetro (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

V.5.2) Neutralización de actividad hemorrágica

Por cada inóculo de 0.1 mL se prepararon mezclas de neutralización que contienen 10 μ L de FHP del veneno (1.32 μ g/ μ L para la primera prueba y 0.132 μ g/ μ L para la

segunda) y 90 µg de anticuerpo de un solo dominio y se completó con PBS hasta 0.1 mL. Se dejó incubar a 37 °C por 1 hora, luego se inóculo vía intradérmica en ratones. Después de dos horas se sacrificaron a los ratones y se evaluó el halo hemorrágico. Se seleccionó a los que presentaban neutralización para luego realizar los ensayos de dosis efectiva media.

V.5.3) Dosis Efectiva Media (DE₅₀)

La capacidad neutralizante de los anticuerpos de un solo dominio fue expresado como la dosis efectiva 50% (DE₅₀), es decir, la proporción µL de antiveneno/mg de veneno, que redujo al 50% la actividad de la dosis reto del veneno (4 DHM que es 1.732 µg), se preparó un control positivo que solo contenía veneno y un control negativo que solo contenía anticuerpo de un solo dominio, para las muestras a ensayar se mezcló la dosis reto 4 DHM (1.732 µg) de veneno con cantidades variables de anticuerpo de un solo dominio de tal manera que los radios µL de antiveneno/mg de veneno fueron de 57.74, 962.28, 5773.67, 11547.34 y 28868.36. Se incubó a 37 °C por 1 hora y luego se inóculo vía intradérmica en ratones (4 repeticiones por grupo). Después de dos horas se sacrificaron a los ratones y se evaluó el halo hemorrágico. Finalmente se realizó una curva de regresión lineal de los halos hemorrágicos vs radio de µL de antiveneno/mg de veneno y se estimó la DE₅₀.

V.6) Actividad sobre caseína

Se utilizó el método de Takahashi y Ohsaka (1970), estandarizado en el laboratorio de Biología Molecular de la UNMSM. Se determinó la actividad proteolítica con un ensayo sobre caseína al 1% en buffer Tris HCl 0.2 M a pH 8.5. Se adicionó 0.02 mL de la

muestra (veneno) se añadió a la caseína y esta mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a 37 °C en baño maría, la reacción se detiene con ácido tricloroacético (TCA) 0.44 M en hielo. Posteriormente se pasó a centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos, finalmente se midió a 280 nm.

V.7) Ensayo *in vitro* de citotoxicidad

Se usó el kit de ensayo de Alamar Blue (De Souza *et al.*, 2015), estandarizado en el laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud.

En resumen, se prepararon las líneas celulares de mamíferos VERO (4x10⁴ células/pocillo) en Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), gentamicina (50 µg/ml) en placas estériles de 96 pocillos e incubadas por 24 h en condiciones estándar (5% CO₂ en el aire, 37 °C). Luego se mezcló las células VERO con el veneno total o con la fracción hemorrágica pesada de manera que las concentraciones finales del veneno sean desde 380.9 µg/mL hasta 0.74 µg/mL (factor de dilución 1/2, Tabla A1, anexo) y se incubó en las mismas condiciones estándar por 24 h; Se preparó adicionalmente un control blanco con células VERO sin veneno y un control negativo solo medio EMEM. Luego, se añadió Alamar Blue al 10% a cada pocillo. Se dejó incubar en las mismas condiciones en oscuridad. La absorbancia a 570 nm y 600 nm se determinó después de 4 horas. Los valores representan medios de ensayos realizados por cuadruplicado.

Se graficó el porcentaje de viabilidad celular versus el logaritmo de la concentración final de veneno usado. Para determinar el porcentaje de viabilidad celular se usó la fórmula:

$$\% \text{viabilidad celular} = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(O_2 \times P_1) - (O_1 \times P_2)} \times 100$$

O₁= Coeficiente de extinción molar (E) del Alamar blue oxidado (azul) a 570 nm

O_2 = Coeficiente de extinción molar (E) del Alamar blue oxidado a 600 nm

A_1 =Absorbancia de pocillos de test a 570 nm

A_2 = Absorbancia de pocillos de test a 600 nm

P_1 = Absorbancia de pocillos control de crecimiento positivo (blanco) a 570 nm

P_2 = Absorbancia de pocillos control de crecimiento positivo (blanco) a 600 nm

La concentración efectiva capaz de reducir en un 50% la viabilidad celular (CD_{50}) se determinó a partir de la curva de dosis-respuesta, utilizando el software Graph Pad Prism 8.00.

V.8) Neutralización *in vitro* de citotoxicidad

Se usó el kit de ensayo de Alamar Blue (De Souza *et al.*, 2015), estandarizado en el laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud.

Se prepararon las líneas celulares de mamíferos VERO (4×10^4 células/pocillo) en Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), gentamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) en placas estériles de 96 pocillos e incubadas por 24 h en condiciones estándar (5% CO_2 en el aire, 37 °C). A la par se incubó 1 hora a 37 °C cada uno de los nanoanticuerpos (20 μg) con la fracción hemorrágica (30 μL) y de este se cogió 40 μL y se agregó a cada pocillo (por triplicado para cada nanoanticuerpo) que contenían las células VERO. Luego se incubó en las mismas condiciones estándar por 24 h; Se preparó adicionalmente un control blanco con células VERO sin fracción hemorrágica y un control negativo solo medio EMEM. Además, para evaluar el efecto citotóxico de los nanoanticuerpos estos fueron incubados solos en células VERO del mismo modo, también por triplicado. Luego, se añadió Alamar Blue al 10% a cada pocillo. Se dejó incubar en las mismas condiciones en oscuridad. La absorbancia a 570 nm y 600 nm se determinó después de 4 horas para calcular el % de viabilidad celular según la formula antes indicada.

VI. RESULTADOS

VI.1) Purificación de proteína del veneno de *Bothrops atrox* por cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex G-100 y actividades biológicas.

El paso de purificación empleando una columna de filtración molecular sobre Sephadex G-100, reveló tres picos principales de proteínas (Figura 9). Se midió la actividad hemorrágica de las fracciones del primer pico; encontrándose actividad hemorrágica en la fracción 13 la cual corresponde a metaloproteasas de alto peso molecular probablemente a metaloproteasas tipo III. Para este estudio se seleccionó la fracción 13 (2 mL) de alto peso molecular y gran actividad hemorrágica.

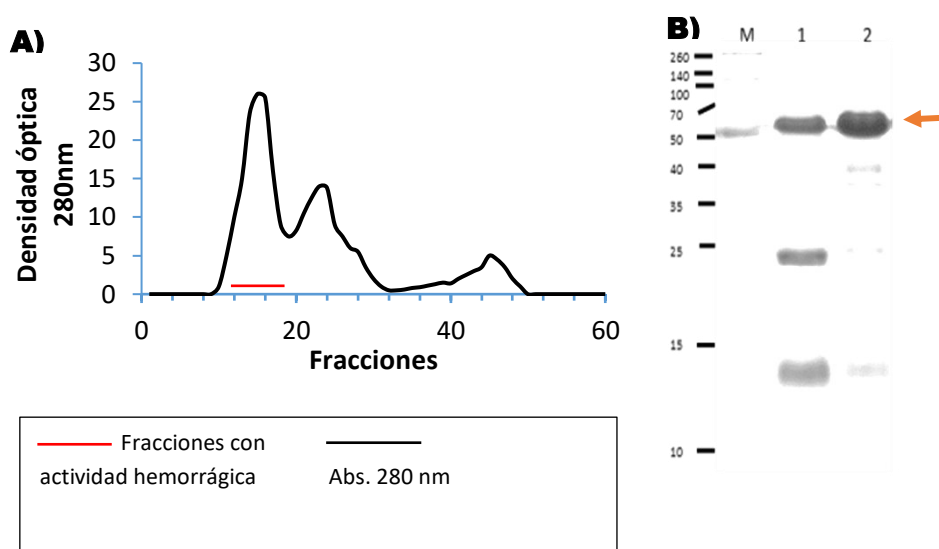


Figura 9. Cromatograma sobre gel de exclusión molecular Sephadex G-100 del veneno de *Bothrops atrox*. **A)** Cromatograma de veneno de *Bothrops atrox* y fracciones con actividad hemorrágica **B)** PAGE-SDS, **M:** Marcador de peso molecular (10 kDa -260 kDa) Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher), **1:** Veneno total de *B. atrox* y **2:** Fracción 13 (FHP: ~55 kDa) con actividad hemorrágica (flecha anaranjada).

Con este paso de purificación se logró obtener la enzima con un rendimiento de 5.7% y un factor de purificación de 1,08 veces (Tabla 7). En el ensayo de actividad proteolítica sobre caseína, se halló que la fracción con actividad hemorrágica poseía 67.6 U/mg (Tabla 7) de actividad proteolítica. Por PAGE-SDS, la fracción parcialmente purificada presentó un peso molecular de cerca de 55 kDa en condiciones no reductoras.

Tabla 7. Purificación parcial de la metaloproteasa tipo III de *Bothrops atrox*.

Actividad específica proteasa: µg de L-tirosina/mg de proteína

U.T.A.: Unidades totales de actividad

Muestra	Proteína (mg)	% Proteína	Actividad específica (U/mg)	U.T.A.	Rendimiento (%)	Purificación
Veneno crudo	500.0	100.00	62.6	31300	100.00	1.00
Sephadex G-100	26.4	5.28	67.6	1784	5.70	1.08

Además, la actividad hemorrágica hallada correspondió a una dosis hemorrágica mínima (DHM) de 0.433 µg para la fracción 13 del veneno de *B. atrox* (Figura 10), y de 0.810 µg para el veneno crudo, esto es corresponde a un aumento de la potencia hemorrágica de 1.9 veces. Adicionalmente se evaluó la capacidad inhibitoria del EDTA sobre el veneno total de la fracción hemorrágica pesada. Se halló que el EDTA 5 mM causó una inhibición de la actividad proteolítica sobre caseína de 92.0 % para el caso del veneno total de *B. atrox* y para el caso de la fracción hemorrágica pesada del 95.9 % (Tabla 8)

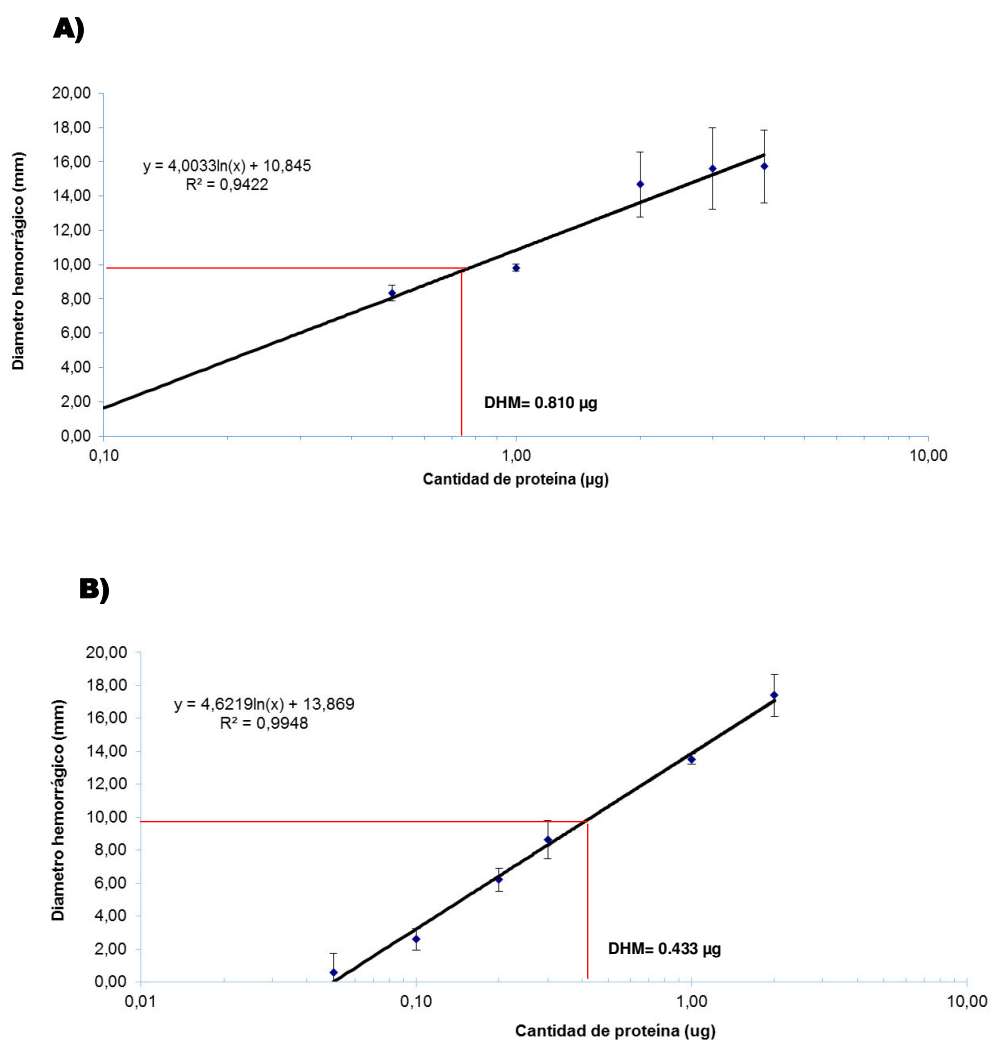


Figura 10. Dosis hemorrágica mínima (DHM) de A) veneno total de *B. atrox*. B) fracción hemorrágica pesada de *B. atrox*.

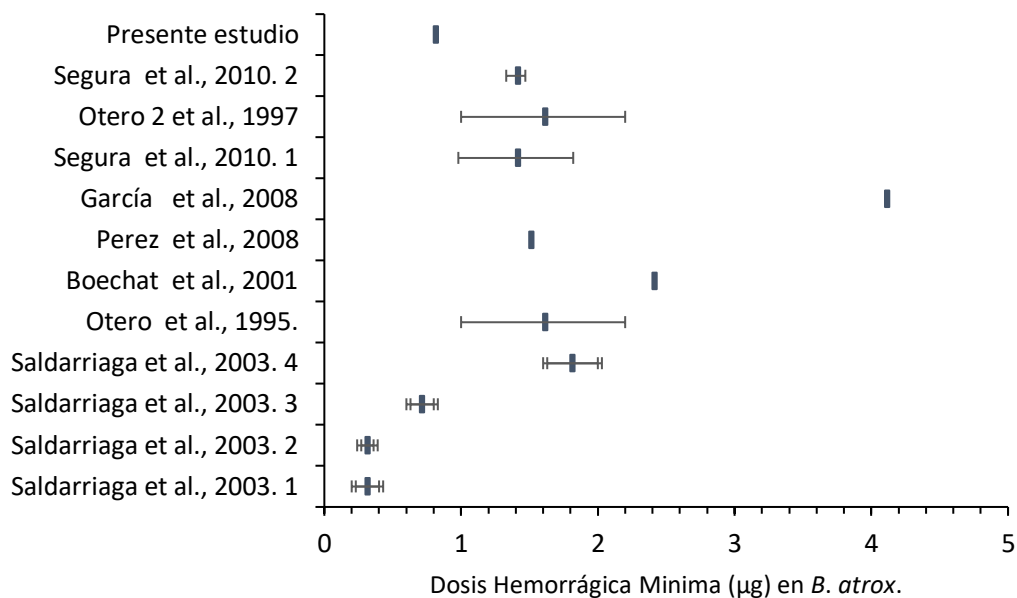


Figura 11. Dosis hemorrágica mínima (DHM) de veneno total de *B. atrox* de estudios previos y el presente estudio.

Tabla 8. Inhibición de la actividad proteolítica la fracciones hemorrágica pesada. **VT:** veneno total, **FHP:** Fracción con actividad hemorrágica

Agente	Concentración final	Actividad proteolítica (%)
VT <i>Bothrops atrox</i>	-	100.0
EDTA	5 mM	8.0
Agente	Concentración final	Actividad proteolítica (%)
FHP	-	100.0
EDTA	5 mM	4.1

VI.2) Cuantificación de proteínas

La concentración de las fracciones cromatográficas del veneno y el veneno total se midieron por los métodos Bradford y Qubit, la fracción con actividad hemorrágica presentó un concentración de 15.7 µg/µL por Qubit y 13.2 µg/µL por Bradford (Tabla 9), la diferencia es considerable y se usó la cuantificación por Bradford debido a que la curva de calibración de albumina tuvo un $R^2 = 0.9933$ y este método es ampliamente usado para la cuantificación de venenos en procesos de purificación. Por otro lado, el veneno total presenta un concentración de 3.3 µg/µL por Qubit y 5.1 µg/µL por Bradford (Tabla 9).

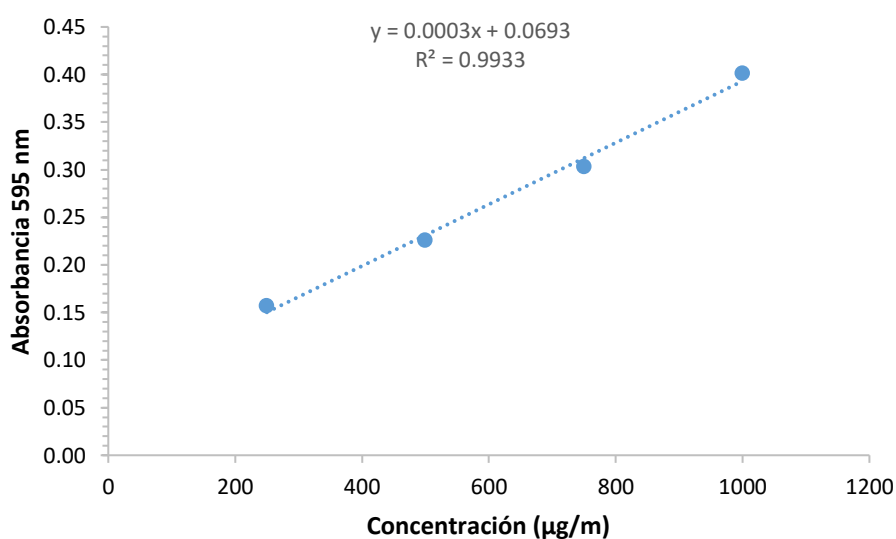


Figura 12. Curva patrón de BSA para para la cuantificación de proteínas por Bradford.

Tabla 9. Cuantificación de veneno total (VT) y fracciones con alta actividad hemorrágica.

Fracción	Concentración	Concentración
	Qubit ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Bradford ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
10	0.90	-
11	4.44	-
12	8.49	-
13*	15.70	13.2
14	22.80	-
15	24.60	-
16	21.60	-
17	15.60	-
18	9.88	-
VT	3.3	5.1

*Fracción hemorrágica pesada que se usa en los ensayos

VI.3) Expresión y purificación de 18 anticuerpos de un solo dominio

El procedimiento para la extracción del extracto periplasmático es un primer paso de purificación ya que como se puede ver en la Figura 13 no se observa la presencia de muchas proteínas contaminantes, esto se debe a que el nanoanticuerpo fue diseñado para tener una secuencia señal que lo va a localizar en el espacio periplasmático. Posteriormente la purificación por afinidad a la cola de histidina por resina de níquel resultó bastante eficiente en todos los nanoanticuerpo. Se obtuvieron anticuerpos de un solo dominio de alto grado de pureza como se observa en la figura 14 A y B por PAGE-SDS al 12 %.

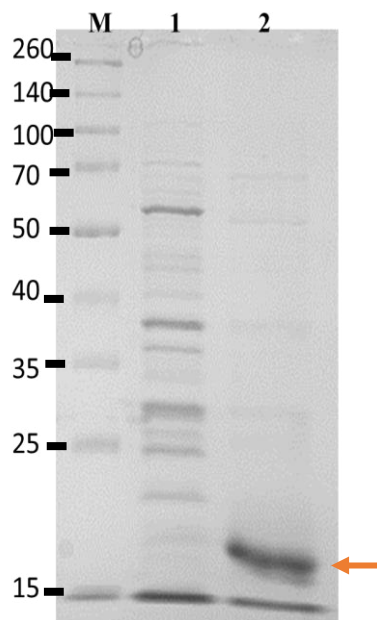


Figura 13. PAGE-SDS al 12% de nanoanticuerpos expresados M: Marcador de peso molecular Spectra Multicolor (fermentas), **1:** extracto periplasmático, **2:** purificación de nanoanticuerpo por resina de níquel.

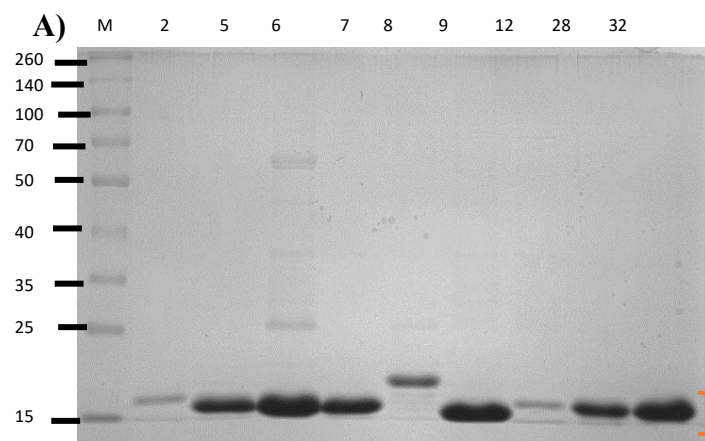
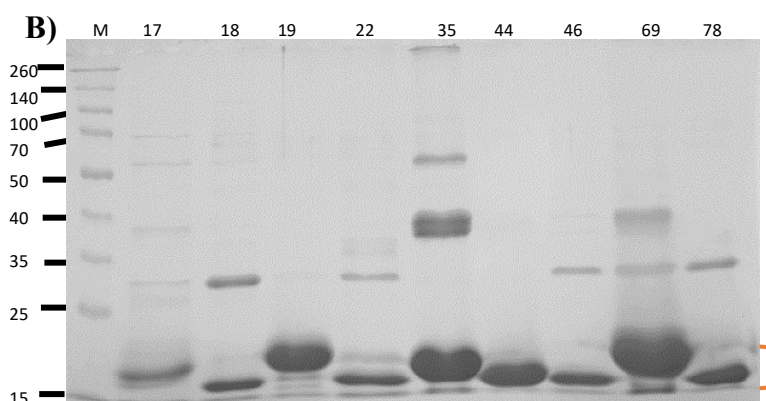


Figura 14. A) y B) PAGE-SDS al 12% de 18 nanoanticuerpos expresados y purificados. M: Marcador de peso molecular Spectra Multicolor (fermentas).



Las concentraciones y rendimientos de producción de los anticuerpos de un solo dominio fue variable pese a que todos se obtuvieron en las mismas condiciones, el rango de rendimientos de los anticuerpos de un solo dominio va desde 0.8 hasta 15.6 mg/L con un promedio de $4.3 \text{ mg/L} \pm 3.9 \text{ mg/L}$ (Tabla 10)

Tabla 10. Producción de 18 anticuerpos de un solo dominio contra veneno de serpiente

Nb	Concentración	Producción	Nb	Concentración	Producción
	($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	(mg/L)		($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	(mg/L)
2	0.27	0.8	19	3.58	10.7
5	0.26	0.8	22	0.57	1.7
6	2.00	6.0	28	0.56	1.7
7	2.36	7.1	32	0.70	2.1
8	1.25	3.8	35	0.51	1.5
9	5.20	15.6	44	2.18	6.5
12	0.66	2.0	46	1.83	5.5
17	0.44	1.3	69	0.90	2.7
18	0.48	1.4	78	1.09	3.3
Promedio ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				1.38	4.34
Desviación estándar				1.31	3.91

VI.4) Tamizaje de neutralización de la actividad hemorrágica

Se realizaron dos ensayos y se evaluó la capacidad neutralizante de la actividad hemorrágica, de la fracción pesada, de 18 anticuerpos de un solo dominio recombinantes, de las 18 solo 7 mostraron capacidad de neutralizar la actividad hemorrágica del veneno a las condiciones dadas (Figura 15, Tabla 11). Fueron los

anticuerpos de un solo dominio 6, 9, 12, 22, 28, 35 y 78. Con estos anticuerpos se continuó el ensayo de dosis efectiva media (DE_{50}).

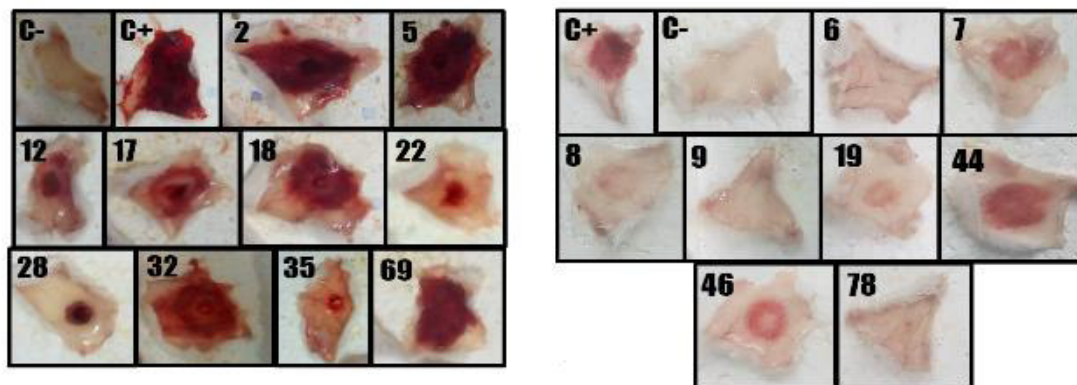


Figura 15. Tamiz de neutralización de la fracción hemorrágica pesada de *B. atrox* de los 18 anticuerpos de un solo dominio (Primera prueba: izquierda. Segunda prueba: derecha).

Tabla 11. Tamiz de neutralización de los 18 anticuerpos de un solo dominio frente a una fracción hemorrágica pesada de *Bothrops atrox*.

Anticuerpos de un solo dominio	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	Halo promedio (mm)	Grado de neutralización	Respuesta
C+	12.1	12.4	12.3	-	-
C-	0	0	0	-	-
6	2.4	0	1.2	++++	Neutralizó
7	9.6	10.5	10.1	++	Parcial
8	0	0	0	+++	Parcial
9	0	0	0	++++	Neutralizó
19	0	0.56	0.28	+++	Parcial
44	11.0	10.5	10.8	-	No neutralizó
46	10.5	12.3	11.4	-	No neutralizó
78	0	0	0	++++	Neutralizó

Anticuerpos de un solo dominio	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	Halo promedio (mm)	Grado de neutralización	Respuesta
C+	>15.0	>15.0	>15.0	-	-
C-	0.0	0.0	0.0	-	-
2	24.0	22.0	23.0	-	No neutralizó
5	23.0	18.0	20.5	-	No neutralizó
12	6.0	7.0	6.5	++++	Neutralizó
17	18.0	6.0	12.0	++	Parcial
18	19.0	18.0	18.5	++	Parcial
22	13.0	9.0	11.0	+++	Neutralizó
28	8.0	10.0	9.0	+++	Neutralizó
32	12.0	11.0	11.5	+	Parcial
35	7.0	6.0	6.5	+++	Neutralizó
69	10.0	15.0	12.5	+	Parcial

VI.5) Dosis hemorrágica mínima (DHM)

Para el veneno total de *Bothrops atrox*, la DHM fue de 0.810 µg por 0.1 mL según la curva de regresión (R^2 : 0.9422). Mientras que la DHM de la fracción con actividad hemorrágica fue de 0.433 µg por 0.1 mL (R^2 : 0.9946) Figura 11.

VI.6) Dosis efectiva media (DE_{50}) de 07 anticuerpos de un solo dominio

Se usó una dosis reto de 4 DHM, es decir 1.73 µg de la fracción con actividad hemorrágica. La dosis efectiva media de los anticuerpos contra la fracción hemorrágica resultaron muy heterogéneos, el mejor resultado se obtuvo con el anticuerpo 12 el cual presentó una DE_{50} de 2 247 µL de anticuerpos/ mg de veneno. Las DE_{50} de los anticuerpos 9, 22, 28, 35 y 78 fueron de 1 319 468, 192 671, 67 371, 21 818 y 65 293 µL de nanoanticuerpos/ mg de veneno, respectivamente. Finalmente el anticuerpo de un solo dominio 6 presentó un bajo grado de neutralización según su DE_{50} (Figura 16).

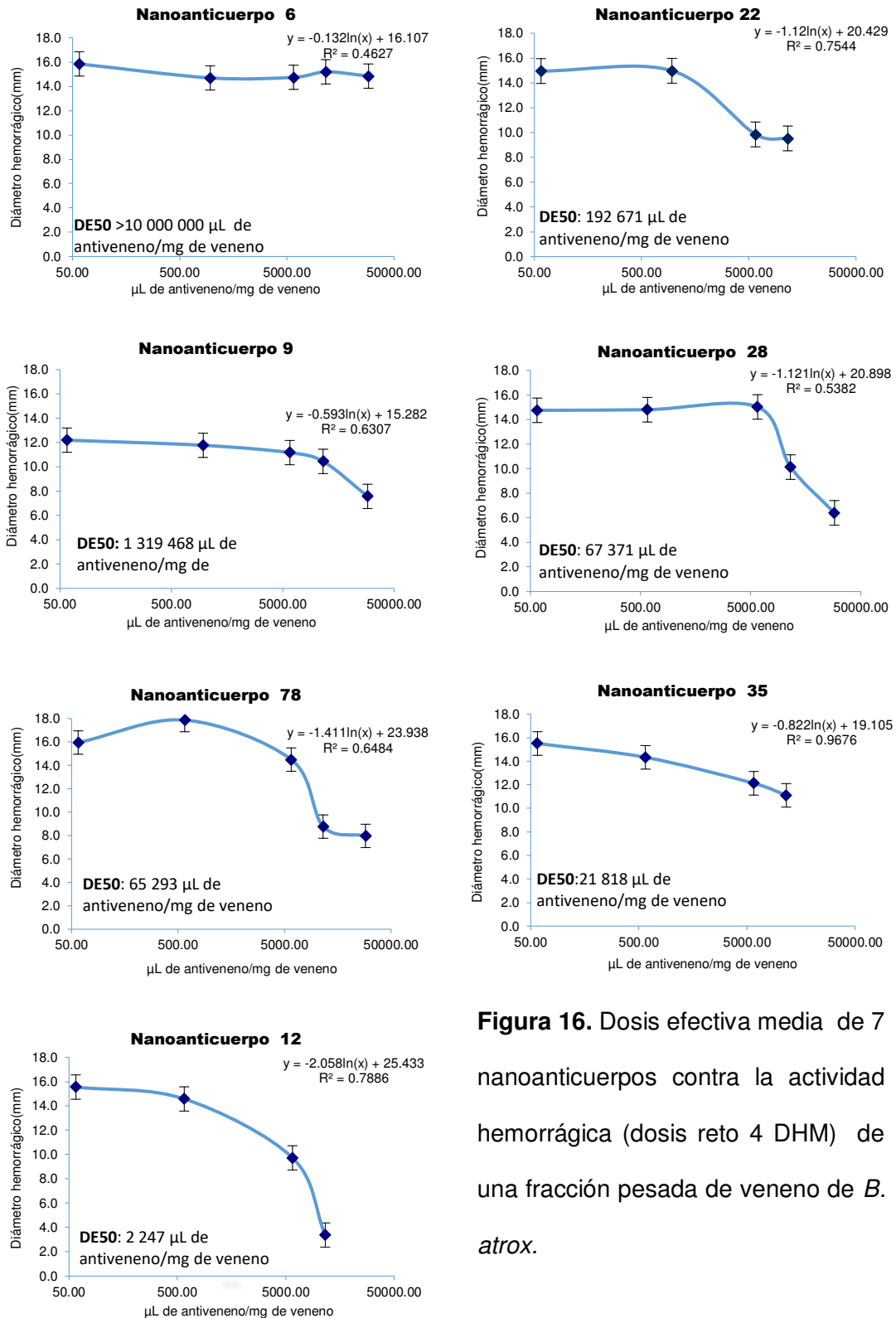


Figura 16. Dosis efectiva media de 7 nanoanticuerpos contra la actividad hemorrágica (dosis reto 4 DHM) de una fracción pesada de veneno de *B. atrox*.

VI.7) Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad del veneno total y fracción hemorrágica pesada se determinó utilizando 10 diluciones en serie desde 380.9 $\mu\text{g/mL}$ hasta 0.74 $\mu\text{g/mL}$ (factor de dilución $\frac{1}{2}$) de cada muestra.

Como se muestra en la Figura 17, el tratamiento con el veneno total de serpiente y con la fracción hemorrágica total dio como resultado una inhibición de la viabilidad celular dependiente de la concentración en células VERO variando el nivel de citotóxicidad.

La actividad citotóxica relativa de las muestras se determinó como la cantidad necesaria para matar el 50% de las células o la dosis citotóxica media (CD_{50}). La fracción hemorrágica fue menos citotóxica con un CD_{50} de 37.28 $\mu\text{g/mL}$ mientras que el veneno total fue más citotóxico con un CD_{50} de 18.82 $\mu\text{g/mL}$.

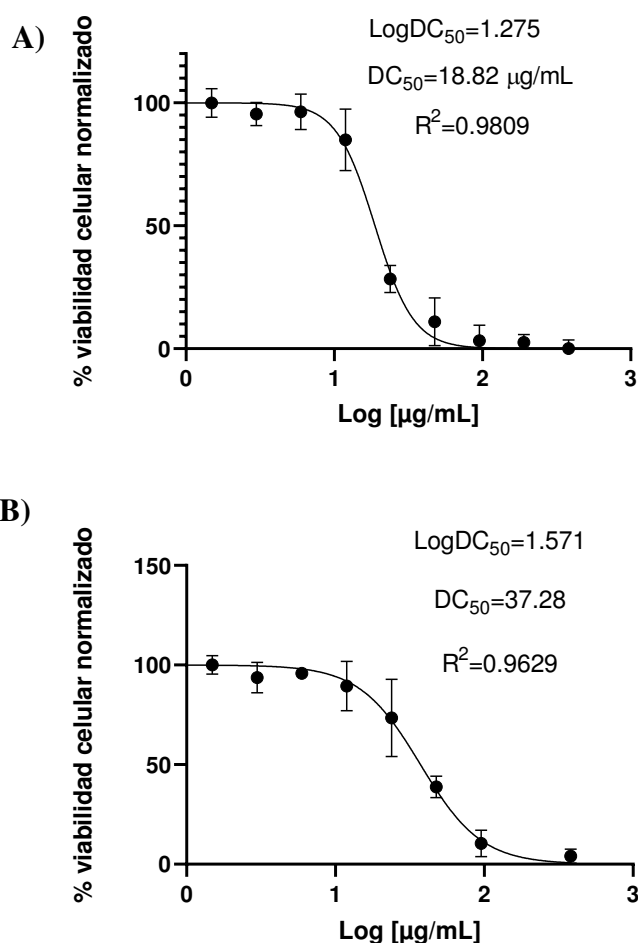


Figura 17. Citotoxicidad del veneno de *Bothrops atrox* y de una fracción hemorrágica pesada. **A)** Ensayo de citotoxicidad *in vitro* del veneno total de *Bothrops atrox* (IC: 17.30-20.46). **B)** Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de la fracción con actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops atrox* (IC: 31.45 – 43.87). La concentración efectiva capaz de reducir en un 50% la viabilidad celular (CD_{50}) se determinó a partir de la curva de dosis-respuesta, utilizando el software Graph Pad Prism

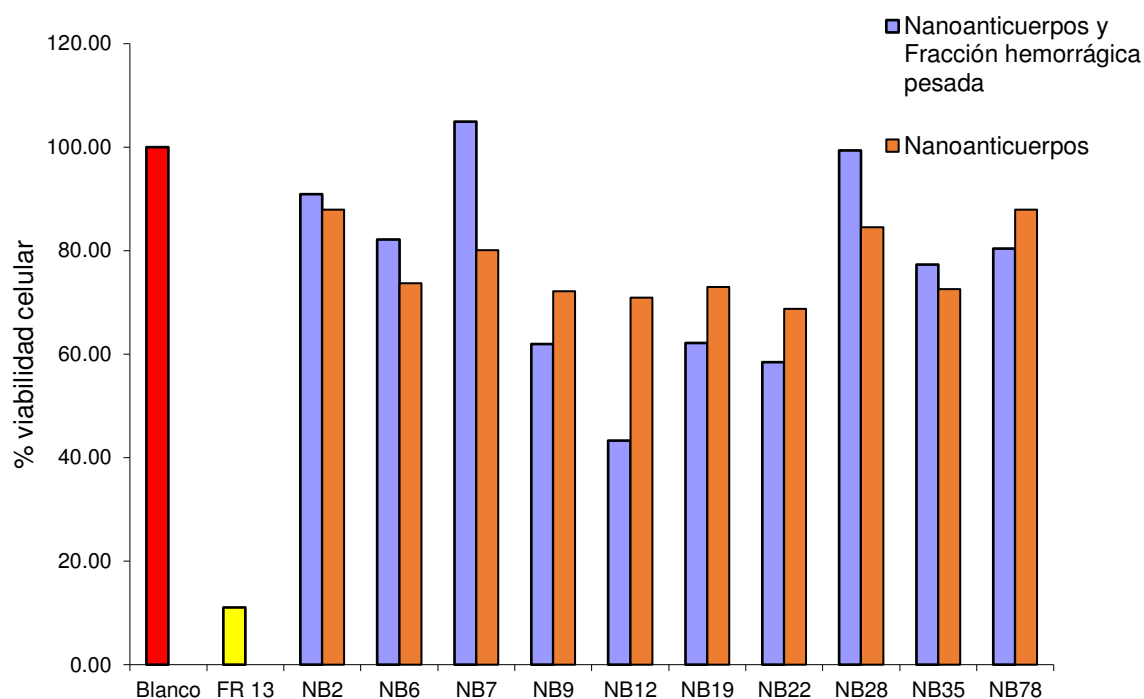


Figura 18. Neutralización de la citotoxicidad en células VERO, se incubó una hora a 37 °C los nanoanticuerpos (20 µg) con la fracción hemorrágica (30 µL) luego se añadió sobre las células VERO (4×10^4 células/pocillo). Se dejó incubar por 24 h a condiciones estándar (5% CO₂ en el aire, 37 °C). Luego se añadió el reactivo Alamarblue y se evaluó después de 4 horas.

VII. DISCUSIÓN

En el Perú, durante el año 2005, se han reportado más de mil casos de mordeduras de serpientes con una tasa de mortalidad del 0,39%. El ofidismo es un problema de salud pública en nuestro país (García *et al.*, 2008). Por este motivo y gracias al avance de las distintas áreas de investigación, es necesario encontrar nuevas alternativas que sean eficaces para estos problemas arraigados en el Perú. La producción de un antídoto en base a anticuerpos de un solo dominio de llama es una propuesta con grandes posibilidades de brindarnos esa solución.

Por un lado, algunos trabajos han propuesto metodologías estándar que permiten obtener anticuerpos de un solo dominio eficaces contra antígenos. Fridy *et al.*, 2014 realizaron la producción de nanoanticuerpos diméricos de alta afinidad contra Green Fluorescent Protein (GFP), en su trabajo lograron obtener un buen rendimiento para la expresión de anticuerpos de un solo dominio y plantearon una metodología para la producción de estos. Además de este, otros trabajos buscan mejorar el rendimiento de la producción de anticuerpos, y nuevos enfoques proponen crear librerías de genes VHH de camélidos no inmunizados de sangre periférica (Sabir *et al.*, 2014).

Trabajos como el de Leow *et al.*, en el 2019 donde compararon la expresión citosólica y periplasmática, de un dominio variable de cadena pesada (VNAR) de tiburón, resulto que la expresión en el citosol produjo un mayor rendimiento en comparación a la periplasmática (468 mg/L y 62 mg/L, respectivamente). Esto se debe al distinto nivel de contenido proteico en ambos compartimientos. Las proteínas en el periplasma están en menos cantidad que en el citoplasma entre un 5 y 15%, del total, dependiendo del estado de crecimiento y del medio de crecimiento que se use (el medio LB, reduce la cantidad de proteínas periplasmáticas) permitiendo una mejor purificación de las proteínas

recombinantes que en el periplasma se produzca (Schmidt *et al.*, 2016). En la expresión de proteínas recombinantes existe un problema inherente al proceso de formación de enlaces disulfuro: el emparejamiento incorrecto de las cisteínas puede causar un incorrecto plegado, la agregación y, en última instancia, dar lugar a bajos rendimientos durante la producción de proteínas (Berkmen *et al.*, 2012). El citoplasma de *E. coli* de cepa silvestre, es un medio reductor por el alto número de reductasas que presenta (vía glutaredoxina y vía thioredoxina, que reciben su potencial reductor de los numero NADPH del citoplasma), por lo tanto no permite la formación de puentes disulfuro, una proteína que requiere un enlace disulfuro como los nanoanticuerpos (enlace disulfuro entre CDR1 y CDR3, Noor *et al.*, 2018) tiene que ser secretado y hacer su plegamiento en el periplasma por las proteínas de enlace disulfuro (Dsb) una oxidasa muy potente (Bader *et al.*, 1999; Jander *et al.*, 1994). Soluciones hipertónicas (como el buffer TES) de sacáridos impermeables permiten permeabilizar la membrana externa de bacterias Gram-negativas (Löwe *et al.*, 2018) para realizar el shock osmótico. Además la sobreexpresión de algunas proteínas en el citoplasma de *E. coli* da como resultado la formación de agregados insolubles, o cuerpos de inclusión (Sokolosky, J. T., y Szoka, F. C. ,2013). El aislamiento de los cuerpos de inclusión requiere un paso de replegamiento para obtener una proteína soluble agregando complejidad al proceso y reduce los rendimientos. Proteínas expresadas y traslocadas al periplasma se pueden aislar fácilmente en su estado nativo mediante la ruptura selectiva de la membrana externa de *E. coli*, lo que resulta en una reducción en los pasos de procesamiento, la complejidad y el tiempo (Sokolosky, J. T., y Szoka, F. C. ,2013). Casi todos los trabajos de expresión de nanoanticuerpos están orientados a la expresión en el periplasma de *E. coli*. Es por motivos estructurales, funcionales y de purificación que en la metodología de este trabajo se usó la expresión periplasmática, con la cual se obtuvo buenos niveles de rendimientos y pureza.

Se han reportado en trabajos descritos anteriormente, rendimientos producidos en la expresión de anticuerpos de un solo dominio que van desde 0.5 hasta 10 mg/L por nanoanticuerpo (Hamers-Casterman *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 2018). Acorde con esto en el presente trabajo de investigación los 18 anticuerpos producidos tuvieron un rango de rendimientos desde 0.8 hasta 15.6 mg/L, $4.3 \text{ mg/L} \pm 3.9 \text{ mg/L}$ (Tabla 10).

El rendimiento de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* es alto, en otros microorganismos más complejos como *Pichia pastoris* también se obtienen buenos niveles de expresión. Luévano de la Cruz, A. (2011) expresó una hormona de crecimiento humano HGH con un rendimiento de 76 $\mu\text{g/mL}$. Además, trabajos más recientes (Chen *et al.*, 2019) han logrado rendimientos de 51.57 mg/L de expresión de nanoanticuerpos de llama en *Pichia pastoris*, en este trabajo optimizaron el pH y la fuente de carbono, así como una expresión constitutiva de 90 h, para lograr el máximo rendimiento de un nanoanticuerpo contra una proteína CEACAM-5. Si bien el rendimiento es alto comparado con el obtenido en este trabajo (4.3 mg/L), pero sería poco práctico aplicarlo a producción de anticuerpos de un solo dominio ya que estos no requieren modificaciones postraduccionales para su funcionalidad, aunado a esto la producción en *E. coli* es más fácil y sencilla (Márquez Ipiña, 2011).

Por otra parte, según la actividad proteolítica específica después del paso de purificación sobre Sephadex G- 100, la pureza fue de un 1.08 sin embargo al determinar la DHM (prueba *in vivo*) se observó una elevación de la potencia hemorrágica a 1.9 veces (0.81 μg del veneno total y 0.433 μg de la fracción hemorrágica), esto se debe a que no existe una correlación entre la actividad *in vitro* y el ensayo *in vivo* (Lopes de Souza *et al.*, 2015). Tampoco se ha encontrado una correlación entre el valor dosis hemorrágica mínima y la actividad proteolítica *in vitro* de la fracción con actividad hemorrágica. Es probable que la especificidad de la hidrólisis *in vivo* por la fracción hemorrágica de ciertos sustratos de alto peso molecular como por ejemplo colágeno de tipo IV sea más importante, y distinta, que la tasa de hidrólisis de caseína por estas enzimas. Por esto,

en el presente estudio se analizó la actividad hemorrágica para la selección de algunas fracciones del veneno en lugar de la actividad proteolítica; añadido a esto, está la presencia de proteínas con actividad caseinolítica en el veneno de *Bothrops atrox* que no son hemorrágicas (Omori-Satoh *et al.*, 1972).

El agente quelante EDTA inhibe la actividad proteolítica en el veneno total de *B. atrox* y en la fracción hemorrágica usada (Tabla 8) como se a visto en trabajos anteriores, ya que las metaloproteasas del veneno son las principales causantes de la actividad proteolítica (Patiño *et al.*, 2010).

Saldarriaga *et al.*, en el 2003 encontraron una diferencia ontológica a nivel de los venenos de *B. atrox*; en la actividad hemorrágica encontraron valores de DHM de $0.3 \pm 0.10 \mu\text{g}$, $0.3 \pm 0.06 \mu\text{g}$, $0.7 \pm 0.10 \mu\text{g}$ y $1.8 \pm 0.20 \mu\text{g}$ para edades de 6 meses, 1 año, 2 años y 3 años, respectivamente (Figura 11). Mostrando la variación existentes en la composición del veneno a los largo de su vida y notando una disminución en la potencia hemorrágica del veneno conforme avanza la edad. Adicionalmente, Otero *et al.*, 1995, midieron la DHM de *B. atrox* en $1.6 \pm 0.6 \mu\text{g}$. Del mismo modo, un trabajo determinó la DHM de *B. atrox* en $1.5 \mu\text{g}$ por 0.1 mL y tiene una DE_{50} de $51.94 \mu\text{L}$ de antiveneno/mg de veneno para un antiveneno comercial (Pérez Chauca *et al.*, 2008). Por otro lado en el 2008 García *et al.*, determinaron la capacidad neutralizante de un antiveneno liofilizado producido en el Instituto Nacional de Salud del Perú, para el veneno de *Bothrops atrox* con Dosis hemorrágica mínima de $4.1 \mu\text{g}$ y una DE_{50} de $230.7 \mu\text{L}$ de antiveneno/mg de veneno; para este caso la concentración de las proteínas del antiveneno fue cuantificada por Lowry y absorbancia a 280 nm con valores de 51.4 mg/mL y 70.7 mg/mL , respectivamente. Además, Gutiérrez *et al.*, en 1985 encontró que existe neutralización cruzada de un antiveneno botrópico polivalente comercial de Costa Rica sobre distintos venenos de serpientes del genero *Bothrops*, presentaban una DE_{50} efectiva por ejemplo para *B. picador* encontró un valor de $430 \mu\text{L}$ de antiveneno/mg de veneno (altamente efectiva). Acorde con lo reportado anteriormente en el presente

trabajo se encontró que el veneno total presentaba una DHM de 0.81 μg y la fracción hemorrágica 0.433 μg . Las variaciones en la dosis hemorrágica mínima entre estos trabajos sobre veneno total de *B. atrox* se debe a diferencias de edad, región y estado fisiológico de las serpientes (Figura 11, Saldarriaga *et al.*, 2003). La disminución de DHM entre el veneno total (0.81 μg) y la fracción hemorrágica (0.433 μg) significa un aumento en la potencia de la actividad hemorrágica de esta fracción y se debe a que la purificación por Sephadex G-100 separó una fracción con mucho contenido de proteínas de alto peso molecular y elevada actividad hemorrágica, estando presentes en este grupo principalmente metaloproteasas de tipo III.

Por otro lado, Segura, A., *et al.*, 2010 evalúa la capacidad de 7 sueros antibotrópicos comerciales para diferentes regiones, de neutralizar los efectos biológicos de varios venenos de serpientes del género *Bothrops* entre ellos *B. atrox* de Colombia (DHM: 1.4 μg) y *B. atrox* de Perú (DHM: 1.4 μg). Las concentraciones de proteína de los antiveneno fueron medidas por el método de Biuret (24, 36, 47, 46, 75, 80 y 56 mg/mL) y tuvieron capacidad de neutralizar la actividad hemorrágica de *B. atrox* de Perú (DHM: 1.4 μg) con DE_{50} de 342, 270, 324, 808, 236, 148 y 835 μL de antiveneno/mg de veneno y de neutralizar la actividad hemorrágica de *B. atrox* de Colombia (DHM: 1.4 μg) con DE_{50} de 135, 98, 90, 306, 61, 76 y 195 μL de antiveneno/mg de veneno. Por otra parte Otero *et al.*, 1999, evalúa la capacidad de 3 antibotrópicos comerciales, de diferentes regiones, para neutralizar los efectos biológicos del veneno de *B. atrox* (DHM: 1.6 μg) encontrando que tuvieron la capacidad de neutralizar la actividad hemorrágica de *B. atrox* (DHM: 1.6 μg) con una DE_{50} de 71, 66 y 121 μL de antiveneno/mg de veneno. Mas adelante mediante el método de Lowry, Otero *et al.*, en el 2002 cuantificaron 4 antivenenos polivalentes, cuyas concentraciones fueron de 60, 56, 147 y 52 mg/mL y determinaron que la DE_{50} de estos cuatro antivenenos para la actividad hemorrágica del veneno de *Bothrops asper* fueron de 61, 524, 295 y 40 μL de antiveneno/mg de veneno para las concentraciones de 147, 52, 56 y 60 mg/mL, respectivamente. En contraste,

en este trabajo se encontró que el mejor candidato de anticuerpo recombinante de un solo dominio tuvo una DE_{50} de 2 247 μ L de antiveneno/mg de veneno y el promedio de la concentración de los 18 anticuerpos de un solo dominio fue de 1.38 mg/mL; muy por debajo de lo que se reportó en otros antivenenos comerciales. Estos resultados se pueden deber a que para determinar la dosis efectiva media se mide la cantidad en volumen (μ L) que neutraliza una cantidad constante de veneno (dosis reto, μ g) sin tomar en consideración en ningún momento la concentración del antiveneno, esto se debe a que generalmente los antivenenos tienen diferentes concentraciones de proteínas incluso de lote a lote de antiveneno, debido, intrínsecamente, al proceso de fabricación (Otero *et al.*, 2002), porque ninguna ley o reglamento exige normalizar la concentración de proteínas de los sueros antibotrópicos producidos. Además, La dosis efectiva se expresa en unidades de μ L de antiveneno que neutraliza 1 mg de veneno. Sin embargo sabiendo que una mayor concentración del antiveneno a inocular implica una mayor cantidad de proteína, aumentándose así el riesgo de una reacción anafiláctica. (Rodríguez *et al.*, 2004).

Se encontró que el nanoanticuerpo 6 a pesar de que aparentemente neutralizó en el ensayo tamiz de neutralización, no neutralizó la actividad hemorrágica según su curva de dosis efectiva media. Esto se puede deber a que en los ensayos de actividad hemorrágica solo se midió el halo hemorrágico sin tomarse en cuenta la intensidad de la hemorragia, esto es una problema de omisión obviado en la mayoría de estudios, debido a que la intensidad hemorrágica probablemente simbolice la cantidad de extravasación de sangre, para superar esta dificultad algunos autores proponen un procedimiento basado en la extracción de la hemoglobina presente en la hemorragia y su cuantificación mediante la lectura a 540 nm (Pérez Chauca *et al.*, 2008). Por otro lado Jenkins *et al.*, (2017) exhiben el problema de la omisión de la intensidad al momento de medir la potencia hemorrágica de los venenos y mediante el uso de herramientas bioinformáticas proponen una solución, combinar el área hemorrágica y la intensidad

hemorrágica con una herramienta de análisis de imagen gratuita (Inkscape 0.91) para producir valores cuantificables de la actividad hemorrágica (en unidades HaU). Como dicen los autores se logra reducir el tiempo, mejorar el resultado y su implementación y uso es fácil. En su trabajo se encontró una correlación directamente proporcional entre la cantidad de hemoglobina trasvasada (g/L) y las unidades hemorrágicas (HaU).

En el presente estudio no se observó una relación entre el ensayo de neutralización *in vivo* e *in vitro*.

Novak Zobiole, N., *et al.*, en el 2015 evaluaron la citotoxicidad del veneno de *Bothrops moojeni* en células VERO obtuvieron una CD_{50} de 4.09 ± 0.04 $\mu\text{g/mL}$, también observaron que la citotoxicidad de este veneno es dosis-dependiente. Además, Guerra-Duarte *et al.*, en el 2015 encontraron que la citotoxicidad del veneno de *Bothrops atrox* en líneas celulares VERO fue de 12.12 $\mu\text{g/mL}$. Acorde con esto, en este trabajo el ensayo de citotoxicidad se observó una toxicidad considerable para el veneno de *B. atrox*.

Girón *et al.*, en el 2005 al separar el veneno de serpiente *Crotalus vegrandis* por una cromatografía de filtración, encontraron un primer pico de alto peso molecular que presentaba una elevada actividad hemorrágica. Evaluaron la citotoxicidad del veneno total y de la fracción hemorrágica de alto peso molecular encontrando una reducción de la citotoxicidad (4.92 $\mu\text{g/mL}$ del veneno total y 18.4 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción hemorrágica). Aunado a esto, Viala *et al.*, en el 2015 observaron que en el análisis proteómico de *C. vegrandis* muestra alto contenido de proteínas metaloproteasas del tipo III de alto peso molecular 55-75 kDa y LAAO de alto y mediano peso molecular 35-66 kDa. Acorde con esto, en este trabajo la fracción hemorrágica fue menos citotóxica con un CD_{50} de 37.28 $\mu\text{g/mL}$ mientras que en el veneno total fue más citotóxico con un CD_{50} de 18.82 $\mu\text{g/mL}$. Todo esto indica que la actividad citotóxica está más relacionada a LAAO y menos a las metaloproteasas. Por eso que la fracción pesada con alta actividad hemorrágica, tiene una menor citotoxicidad, posiblemente propiciado por la presencia de LAAO.

LAAO ha demostrado estar relacionada con la agregación e inhibición plaquetaria, la formación de edema y puede ejercer efectos citotóxicos en bacterias, Leishmania, tumores y linajes de células de mamíferos normales. (Izidoro *et al.*, 2006; Naumann *et al.*, 2011; Stábeli *et al.*, 2007). Además otros trabajos anteriores demostraron una correlación significativa entre la LAAO y la citotoxicidad *in vitro* ($r=0.97$, $p < .05$). (Lopes de Souza *et al.*, 2015). Luego, Guerra-Duarte *et al.*, en el 2015 también observaron una relación entre un ensayo de actividad *in vitro* para LAAO y la citotoxicidad en tres líneas celulares, células VERO, MGSO3 y HeLa. Por otro lado encontraron que en el género *Bothrops* existe alta actividad LAAO y actividad metaloproteínasa. En este trabajo, para la fracción hemorrágica se observó una citotoxicidad menor lo cual probablemente se debe a que en la purificación se seleccionó una fracción hemorrágica y probablemente se perdió una gran cantidad de LAAO del veneno total que lleva a la reducción del efecto citotóxico del veneno. Adicionalmente al no tener un alto grado de pureza es probable que LAAO presente esté influyendo en gran medida en la citotoxicidad de esta fracción.

Por lo mencionado anteriormente, se sabe que la LAAO está relacionada a la citotoxicidad directamente, sin embargo hay evidencia de que otras proteínas, también en menor medida, tienen esta capacidad o que funcionen en sinergia con la LAAO. Acorde con esto, se demostró que una fosfolipasa A2 ácida del veneno de *Bothrops moojeni*, con efectos bactericidas y de anti-agregación plaquetaria, tiene una actividad citotóxica moderada dependiente de la dosis, trabajando en tres líneas celulares tumorales (Jukart, SKBR3 y EAT) (Silveira *et al.*, 2013). Del mismo modo, Oliveira *et al.*, en el 2002 encontraron citotoxicidad de *B. atrox*, 34.64 µg/mL en células VERO. En ese trabajo se observa una relación entre la actividad proteolítica y la citotoxicidad, aunque no significativa, algunos autores sugieren que proteínas proteolíticas también pueden estar relacionadas al efecto citotóxico del veneno.

En este trabajo 10 nanoanticuerpos (7 neutralizan y 3 no neutralizan la actividad hemorrágica) mostraron capacidad de neutralizar la citotoxicidad (Figura 18), esto se debería a que las proteínas citotóxicas como la LAAO u otras que actúan en sinergia con LAAO permanezcan en la fracción hemorrágica pesada.

VIII. CONCLUSIONES

- Se evidenció la existencia de anticuerpos recombinantes de un solo dominio de llama (*Lama glama*) con capacidad neutralizante de la actividad hemorrágica de una fracción del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*.
- Por PAGE-SDS se determinó un peso molecular de 55 kDa para la proteína en la fracción hemorrágica en condiciones no reductoras.
- La DHM para la fracción pesada fue 0.433 µg y para el veneno total de *B. atrox* 0.81 µg.
- En la expresión en *E. coli* el rendimiento de anticuerpos de un solo dominio fue de 4.34 µg/µL ± 3.91 µg/µL.
- La dosis efectiva media para la actividad hemorrágica de un anticuerpo de un solo dominio fue de 2 247 µg de antiveneno/ mg de veneno.
- Las dosis citotóxicas medias para el veneno total y la fracción hemorrágica pesada (~55 kDa) fueron 18.82 µg/mL y 37.28 µg/mL, respectivamente.

IX. RECOMENDACIONES

La producción de nanoanticuerpos no solo debe aplicarse a venenos de serpientes sino más extensamente para cualquier otra ponzoña que sea un problema de salud pública. Además por las características intrínsecas los anticuerpos de un solo dominio también sería aplicable a otros campos, por ejemplo la producción de kits de diagnóstico

Se espera que en el futuro se complemente el presente trabajo para producir a mayor escala una mezcla de anticuerpos de un solo dominio con capacidad neutralizante de las distintas actividades biológicas del veneno de *Bothrops atrox*.

Los anticuerpos de un solo dominio son proteínas purificadas, es probable que al mezclarlas entre si la sinergia pueda potenciar la neutralización de la actividad hemorrágica e incluso la letalidad del veneno.

El nanoanticuerpo 6 que mostro una mayor neutralización de la actividad hemorrágica puede ensayarse más adelante en reacción cruzada sobre venenos de otros miembros del genero *Bothrops*. Debido al tiempo de vida corto que presentan los nanoanticuerpos se podría plantear mas adelante otros trabajos para el diseño de dinanoanticuerpos (nanoanticuerpos diméricos) o diseñar el nanoanticuerpo 6 fusionado a una región constante de anticuerpo humano, logrando aumentar su tiempo de vida en el suero.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achê, D. C., Gomes, M. S. R., de Souza, D. L. N., Silva, M. A., Brandeburgo, M. I. H., Yoneyama, K. A. G. *et al.*, V. (2015). Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: Inhibition of cell adhesion and angiogenesis. *International journal of biological macromolecules*, 72: 445-453.
- Achour, I., Cavelier, P., Tichit, M., Bouchier, C., Lafaye, P., y Rougeon, F. (2008). Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. *The Journal of Immunology*, 181(3), 2001-2009.
- Adan, A., Kiraz, Y., y Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(14), 1213-1221.
- Anderson, G. P., Liu, J. H., Zabetakis, D., Liu, J. L., y Goldman, E. R. (2017). Thermal stabilization of anti- α -cobratoxin single domain antibodies. *Toxicon*, 129, 68-73.
- Andrade-Silva, D., Ashline, D., Tran, T., Lopes, A. S., Cardoso, S., Da Silva Reis, M., Reinhold, V. (2018) Structures of N-Glycans of *Bothrops* venoms revealed as molecular signatures that contribute to venom phenotype in viperid snakes. *Molecular and Cellular Proteomics*, 17(7).1261-1284.
- Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C., y Bardwell, J. C. (1999). Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell*, 98(2), 217-227.
- Bagheri, M., Babaei, E., Shahbazzadeh, D., Habibi-Anbouhi, M., Alirahimi, E., Kazemi-Lomedasht, F., y Behdani, M. (2017). Development of a recombinant camelid specific diabody against the heminecrolysin fraction of *Hemiscorpius lepturus* scorpion. *Toxin Reviews*, 36(1), 7-11.

Baldo, C., Tanioni, I., Leon, I., batista, I., Della Cas, M., Clissa, P. (2018). BNP1, a novel P1 metalloproteinase from *Bothrop neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararjagin, a P-III SVMP. *Toxicon*, 51 (1):54-65

Beghein, E. y Gettermans, J. (2017) Nanobody technology: a versatile toolkit for microscopic imaging, protein-protein interaction analysis, and protein function exploration. *Frontiers in immunology*, 8,771.

Bentley, W., Mirjalili, N., Andersen, D., Davis, R., y Kompala, D. (1990). Plasmid-encoded protein: the principal factor in the metabolic burden associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and bioengineering*, 35 (7),668-681

Berkmen, M. (2012) Production of disulfide bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 82 (1), 240-251.

Bhat, S. K., Joshi, M. B., Ullah, A., Masood, R., Biligiri, S. G., Arni, R. K., y Satyamoorthy, K. (2016). Serine proteinases from *Bothrops* snake venom activates PI3K/Akt mediated angiogenesis. *Toxicon*, 124: 63-72.

Bjarnason ,J., Fox, J. (1994) Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. *PT*, 62 (3) , 325-372.

Boechat, A. L. R., Paiva, C. S., França, F. O., y Dos-Santos, M. C. (2001). Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* envenoming. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43(1), 07-14.

Borrebaeck, C. y Ohlin, M. (2002) Antibody evolution beyond nature. *NB*, 20 (12), 1189.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Calvete, J., Sanz, L., Perez, A., Borges, A., Vargas, A., Lomonete, B., y Furtado, M., (2011) Snake population of *Bothrops atrox*: paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. JP, 74 (4), 510-527.
- Campbell, J. A. (2004). The venomous reptiles of the western hemisphere (No. 597.96165 C3).
- Casewell, N., Huttley, G., y Wuster, W. (2012) Dynamic evolution of venom proteins in squamate reptiles. Nature communications, 3, 1066.
- Chen, S., Li, S., Sun, H., Li, Y., Ji, S., Song, K., Zhang, L., Luo, Y., Sun, Y., Ma, J. y Liu, P. (2018). Expression and characterization of a recombinant porcine antibody against the E2 protein of classical swine fever virus. Applied microbiology and biotechnology, 102(2), 961-970.
- Chen, Q., Zhou, Y., Yu, J., Liu, W., Li, F., Xian, M., Nian, R., Song, H. y Feng, D. (2019). An efficient constitutive expression system for Anti-CEACAM5 nanobody production in the yeast *Pichia pastoris*. Protein expression and purification, 155, 43-47.
- Conrath, K., Vincke, C., Stiklemans, B., Schymkowitz, J., Decanniere, K., Wyns, L., y Loreis, R. (2005). Antigen Binding and solubility effects upon the vennering of a camel VHH in framework 2 to mimic a VH. JMB, 1 (350), 112-125.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. Northern clinics of Istanbul, 3(2), 156.
- Davies, J., y Riechmann, L. (1994). 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains. FEBS letters, 339(3), 285-290.
- Darvish, M., Behdani, M., Shokrgozar, M. A., Pooshang-Bagheri, K., y Shahbazzadeh, D. (2015). Development of protective agent against *Hottentotta saulcyi* venom using camelid single-domain antibody. Molecular immunology, 68(2), 412-420.

De Bruin, R. Van der kruk, L. Van der Vliet. (2016). Highly specific and potently activating Vy9vd2.t cellspecific nanobodies for diagnostic an therapeutic application. CI, 169,128-38

De Souza, L. L., Stransky, S., Guerra-Duarte, C., Flor-Sa, A., Schneider, F. S., y Kalapothakis, E. (2015). Determination of Toxic Activities in *Bothrops spp.* Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between *In Vitro* Versus *In Vivo* Assays. Toxicological sciences, 1, 8.

Desmyter, A., Transue, T. R., Ghahroudi, M. A., Thi, M. H. D., Poortmans, F., Hamers, R. *et al.*, (1996). Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. Nature Structural y Molecular Biology, 3(9): 803-811.

Detalle, L., Palomo, C., Stohr, T. (2016) generation and characterization of alc 0121 a potent nanobody for treatment of respiratory syncital virus infection. AAC, 60 (1): 7-14

Deutscher, M. P. (Ed.). (1990). Guide to protein purification (Vol. 182). Gulf Professional Publishing.

Diaz, M., y Casali, P. (2002). Somatic immunoglobulin hypermutation. Current opinion in immunology, 14(2), 235-240.

Do, R. K., Hatada, E., Lee, H., Tourigny, M. R., Hilbert, D., y Chen-Kiang, S. (2000). Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response. Journal of Experimental Medicine, 192(7), 953-964.

Ebrahimizadeh, W., Gargari, S. L. M. M., Javidan, Z., y Rajabibazl, M. (2015). Production of novel VHH nanobody inhibiting angiogenesis by targeting binding site of VEGF. Applied biochemistry and biotechnology, 176(7): 1985-1995.

Estevao-Costa, M.I, Gontijo, S., Correa, B., Yarleque, A., Vivas Ruiz, D., Rodrigues, E., y Sanchez, E. (2016). Neutralization of toxicological activities of medically-relevant

Bothrops snake venoms and relevant toxins by two polivalente bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil. *Toxicon*, 122,67-77.

Estrada, R., Gutiérrez, J. M., Alvarado, J., Robles, A., Avila, C., y González, N. (1989). Desarrollo de la respuesta de anticuerpos anti-fosfolipasa A, en caballos inoculados con veneno para la producción de suero antiofídico polivalente en Costa Rica. *Rev. Bio. Trop./International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 37(2): 187-191.

Fanning, L. J., Connor, A. M., y Wu, G. E. (1996). Development of the immunoglobulin repertoire. *Clinical immunology and immunopathology*, 79(1), 1-14.

Flajnik, M. F., Deschacht, N., y Muyldermans, S. (2011). A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels?. *PLoS biology*, 9(8), e1001120.

Fox, S., Rathuwithana, A., Kasturiratne, A., Lallo, D., De Silva, H. (2006) Underestimation of snakebite mortality by hospital statistics in the Monaragala District of Sri Lanka. *TRSTMG*, 100 (7) : 693- 695

Fox, J., Serrano, S. (2005) structural considerations of the snake venom, the key members of the M 12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 46 (8) , 969-985

Fox, J. y Serrano, S. (2008) insight into speculations about snake venom metalloproteinase synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity, *Journal FEBS*, 275 (12), 316-330

Freitas-de-Sousa, L. A., Amazonas, D. R., Sousa, L. F., Sant'Anna, S. S., Nishiyama, M. Y., Serrano, S. M. T. *et al.*, (2015). Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. *Biochimie*, 118: 60-70.

Fridy, P. C., Li, Y., Keegan, S., Thompson, M. K., Nudelman, I., Scheid, J. F. *et al.*, (2014). A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nature methods*, 11(12): 1253-1260.

Fry, B. (Ed.). (2015). *Venomous reptiles and their toxins: evolution, pathophysiology and biodiscovery*. Oxford University Press.

Garcia, P., Yarleque, A., Bonilla Ferreyra, C., Pessah, S., Vivas, D., Sandoval, G., Lazo, F. (2008). Características bioquímicas y evaluación preclínica de un antiveneno botrópico liofilizado contra el veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *RPMESS*, 25 (4), 386-390.

Ghahroudi, M. A., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., y Muyldermans, S. (1997). Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS letters*, 414(3), 521-526.

Giron, M., Aguilar, I., Romero, L., Sanchez, E., Rodriguez, A., (2005) a low cost method to test tototoxic effects of *Crotalus vegrandis* venom on kidney cell cultires. *Revista do insitiuto de medicina tropical de sao paulo*, 47, 147-152

Girón, M. E., Salazar, A. M., Aguilar, I., Pérez, J. C., Sánchez, E. E., Arocha-Piñango, C. L. *et al.*, (2008). Hemorrhagic, coagulant and fibrinolytic activities of crude venom and fractions from mapanare (*Bothrops colombiensis*) snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology*, 147(1): 113-121.

Govaert, J., Pellis, M., Deschacht, N., Vincke, C., Conrath, K., Muyldermans, S., y Saerens, D. (2012). Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1970-1979.

Guerra-Duarte, C., Lopes-Peixoto, J., Fonseca-de-Souza, B. R., Stransky, S., Oliveira, D., Schneider, F. S., Lopes-de-Souza, L., Bonilla, C., Silva, W., Tintaya, B. y Yarleque,

A. (2015). Partial *in vitro* analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms. *Toxicon*, 108, 84e96.

Gutierrez, J. (2011). Envenenamientos por mordeduras de serpiente en américa latina y caribe: *Salud ambiental*. 75: 623-645

Gutiérrez, J., Gené, J., Rojas, G., y Cerdas, L. (1985). Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 23(6), 887-893.

Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. (1993). Naturally occurin antibodies of light chain. *Nature*, 363 (6428): 446-448

Higuchi, D. *et al.*, (2011). Leucurogin a new recombinant desintegrin clon from *B. leucurus* with potente activityon platelet aggregation and tumor grow.58 (1)123-128

Hmila, I., Z., Govaert, J., El Ayeb. (2010). a biespecific nanobody to provide full protection against scorpion envenoming. *Journal FASEB*,24(9).

Hmila, I., Sarens, D., Benlasfas, >., Conrat, El Ayeb, M., Muylderman, S., y Bouhala Zahar. (2008). BHH, bivalente domains and chmeric HC- only antibody with high neutralizing efficacy for scorpion toxin Aahl. *MI* 45 (14), 3847-38456.

Holliger, P., Hudson, P. (2005). Engineered antibody fragments and he rise of single domains. *NB*, 23 (9), 1126.

Instituto Clodomio Picado. Manual de metodos de laboratio para la determinacion de actividades toxicas de venenos de serpientes y su neutralizacion por antivenenos. Universidad de Costa Rica. 2007.

Izidoro, L., Ribeiro, M., Souza. (2006) Biochemical and functional characterization of an L- amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *B and medicinal chemistry*, 14 (220), 7034-7048

Jacob-Ferreira, A. L., Menaldo, D. L., Sartim, M. A., Riul, T. B., Dias-Baruffi, M., y Sampaio, S. V. (2017). Antithrombotic activity of Batroxase, a metalloprotease from *Bothrops atrox* venom, in a model of venous thrombosis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95: 263-267.

Jahnichen, S., Blanchetot, C., Maussand, D. (2010). CXCR4 NB (VHH- based single domains) potently inhibit chemotax and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *PNAS*, 107 (47): 20565-20570.

Jander, G., Martin, N. L., y Beckwith, J. (1994). Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation. *The EMBO Journal*, 13(21), 5121-5127.

Janssens, R., Dekker, S., Hendriks, R., Panayotou, G., Van Remoortere, A., San, J., Frosveld, F., Drabek, D. (2006). Generation of HC only antibodies in mice. *PNAS*, 103 (41), 15130- 15135.

Jenkins, T. P., Sánchez, A., Segura, Á., Vargas, M., Herrera, M., Stewart, T. K., Leon, G. y Gutiérrez, J. M. (2017). An improved technique for the assessment of venom-induced haemorrhage in a murine model. *Toxicon*, 139, 87-93.

Jenkins, T. P., Fryer, T., Dehli, R. I., Jürgensen, J. A., Fuglsang-Madsen, A., Føns, S., y Laustsen, A. H. (2019). Toxin Neutralization Using Alternative Binding Proteins. *Toxins*, 11(1), 53.

Jitsuhara, Y., Toyoda, T., Itai, T., y Yamaguchi, H. (2002). Chaperone-like functions of high-mannose type and complex-type N-glycans and their molecular basis. *The Journal of Biochemistry*, 132(5), 803-811.

Kolkhoff, M., Borges, M. H., Yarleque, A., Cabezas ,C. (2012) Exploring the proteomes of the vonmof peruvian pit viper *B. atrox*, *B. barneti* and *B. pictus*. *JP*, 75(7): 2181-2195.

Kondo, H., Kondo, S., Ikezawa, H. (1960). Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. JJMSB, 13 (1): 43-51.

Könning, D., Zielonka, S., Grzeschik, J., Empting, M., Valldorf, B., Krah, S. *et al.*, (2017). Camelid and shark single domain antibodies: structural features and therapeutic potential. Current opinion in structural biology, 45: 10-16.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227: 680-685.

Lazo Manrique, F. E. (2014). Caracterización bioquímica, biológica y molecular de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops pictus* "Jergón de Costa". Cybertesis UNMSM.

Leow, H. C., Fischer, K., Leow, Y. C., Braet, K., Cheng, Q., y McCarthy, J. (2019). Cytoplasmic and periplasmic expression of recombinant shark VNAR antibody in *Escherichia coli*. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 1-13.

Lévano Saravia, J., y Fernández Vera, R. (2004). Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Lima-Perú: Instituto Nacional de Salud.

Lin, Y., Means, G. E., y Feeney, R. E. (1969). The action of proteolytic enzymes on N, N-Dimethyl proteins basis for a microassay for proteolytic enzymes. Journal of Biological Chemistry, 244(4): 789-793.

Loja Oropeza, D. G., Avilés Gonzaga, R., Necochea Villafuerte, Y. U., Vilca Vásquez, M., y Castro Tapia, J. (2000). Ofidismo por *Bothrops atrox*: Estudio clínico-epidemiológico. Diagnostico (Perú), 39(5), 261-265.

Lomonte, B. Cerdas, L., Gene, J., Gutierrez, J. (1982). Neutralization of local effects of the *Bothrops asper* venom by blood serum of the snake. Toxicon, 20(3) : 571. 579.

Löwe, H., Sinner, P., Kremling, A., y Pflüger-Grau, K. (2018). Engineering sucrose metabolism in *Pseudomonas putida* highlights the importance of porins. Microbial biotechnology.

Luévano de la Cruz, A. (2011). Producción, purificación y bioensayo de prolactinas recombinantes (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Malaga, O, Pantiigoso, C., Morante, Y ., Heredia, V ., Cardenas and Yarleque, A. (2000). Variaciones en la composición proteína, actividades enzimáticas y biológicas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Viperidae) en la relación con la edad. RPB. 7 (2) : 161 – 171.

Market, E., y Papavasiliou, F. N. (2003). V (D) J recombination and the evolution of the adaptive immune system. PLoS biology, 1(1), e16.

Martins, N., Ferreira, D., Roidriguez, M., Santos, N., Cintra, A., Santos, A ., Sampaio, S. (2010). Low-molecular mass peptides from the venom of the amazonian viper *Bothrops atrox* protect against brain mitochondrial swelling in rat: potential for neuroprotection. Toxicon , 56 (1) : 86-92.

Martins, N., Santos, N., Sartin, M. (2015). A tripeptide isolate from *Bothrops atrox* venom has neurotrophic effects on a cellular model of parkinson disease. CBI, 235: 10-16.

Maussang, D., Mujic Delic, A., Descamps, F., Storlers, C., Vanlandschoot, P., Stigtes, M. (2013) Llama derived single variable domains directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo. JBC, 2008 (41): 29562 – 29572.

Mello, C. P., Lima, D. B., Bandeira, I. C. J., Tessarolo, L. D., Sampaio, T. L., Falcão, C. B. *et al.*, (2017). Evaluation of the antichagasic activity of batroxidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. Toxicon, 130: 56-62.

Mendoza, J. C., Lazo, F., Yarlequé, L., Ruiz, N. C., Yarlequé, A., Pessah, S. *et al.*, (2008). Efecto del antiveneno botrópico sobre las actividades de fosfolipasa A2, L-

aminoácido oxidasa y hialuronidasa de los venenos de serpientes peruanas. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública, 25(2): 174-178.

Mendoza, J. C., Vivas, D., Rodríguez, E., Inga, R., Sandoval, G., Lazo, F., y Yarlequé, A. (2012). Eficacia experimental de anticuerpos IgY producidos en huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública, 29(1): 69-75.

Moser, J., Prielhofer, R., Gerner, S., Graf, A., Wilsomn, I., Mattanovich, D., Dragosis, M. (2017). Implications of evolutionary engineering for growth and recombinant protein production in methanol based growth media in the yeast *Pichia pastoris*. MCF. 16 (1) : 49.

Muyldermans, S. Atarhouch, T., Barbosa, J. (1994). Secuence and structure of vh domain from naturally occurring camel HC Ig lackin light chains. PEDS, 7 (9): 1129 1135.

Nauman, G., Silva, L., Faria, G., (2011) citototoxic and inhibition of aggregato of platelet caused by an L- aminoacid oxidase from *B. leucurus* venom. BBAGS, 1810 (7), 683-3994.

Navarrete Zamora, M. B., Walter, W. S. S., y Mas, E. V. (2010). Las serpientes venenosas de importancia en la salud pública del Perú. Rev. Elec. Vet., 11(7): 1695-7504.

Nikai, T., Taniguchi, K., Komori, Y., Masuda, K., Fox, J. W., y Sugihara, H. (2000). Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. Archives of biochemistry and biophysics, 378(1), 6-15.

Noor, A., Walser, G., Wesseling, M., Giron, P., Laffra, A. M., Haddouchi, F., de Greve, J. y Kronenberger, P. (2018). Production of a mono-biotinylated EGFR nanobody in the *E. coli* periplasm using the pET22b vector. BMC research notes, 11(1), 751.

Novak Zobiole, N., Caon, T., Wildgrube Bertol, J., Alves de Souza Pereira, C., Mary Okubo, B., Moreno, S. E., y Tramontini Gomes de Sousa Cardozo, F. (2015). *In vitro* and *in vivo* genotoxic evaluation of *Bothrops moojeni* snake venom. *Pharmaceutical biology*, 53(6), 930-934.

Nuñez, V., Cid, P., Sanz, L., De La Torre, P., Angulo, Y., Iomonte, B. (2009). Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Peru and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by trend towards paedomorphism, *JP*, 73 (1): 57 – 78.

Oliveira, J. C. R., de Oca, H. M., Duarte, M. M., Diniz, C. R., y Fortes-Dias, C. L. (2002). Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. *Toxicon*, 40(3), 321-325.

Omori-Satoh, T., Sadahiro, S., Ohsaka, A., y Murata, R. (1972). Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*, a crotalid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 285(2), 414-426.

Ortiz, C., Lazo, F., Bellido, C., Gonzales, E., y Trleque, A. (2012) variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de *Bothrops atrox* de 3 zonas geográficas de Perú. *RPMESS*, 29 (2): 198-205.

Otero, R., Nuñez, V., Gutierrez, J., Robles, A., Estrada, R. (1997) neutralizing capacity of a new monovalent anti- *Bothrops atrox* antivenom: comparison with 2 commercial antivenoms. *BJMBR*, 30, 375-379.

Otero, R., Nuñez, V., Osorio, R. G., Gutiérrez, J., Giraldo, C. A., y Posada, L. E. (1995). Ability of six Latin American antivenoms to neutralize the venom of mapanáequis (*Bothrops atrox*) from Antioquia and Chocó (Colombia). *Toxicon*, 33(6), 809-815.

Paine, M. Desmond, Theakston y crampton (1992) purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic SVMP, from *B. jararaca* venom. JBCm 267 (32): 22869-22876.

Paiva, R. D. M. A., de Freitas Figueiredo, R., Antonucci, G. A., Paiva, H. H., Bianchi, M. D. L. P., Rodrigues, K. C. *et al.*, (2011). Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochimie*, 93(5): 941-947.

Pérez chauca, E. Huayan, S., Mery, C. (2008). Neutralización de la actividad letal inducida por *Bothrops atrox* en ratones cepas balb/c.

Peyvandi, F., Scully, M., Kremer Hovinga, J. A., Cataland, S., Knöbl, P., Wu, H. *et al.*, (2016). Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. J N Engl Med, 2016(374): 511-522.

Prado, N. Pereira, S., Silva, M., Morais, M., Karano, A. (2016) inhibition of miotoxicity induced by *Bothrops Jararacussu* venom and isolated PLA 2 by specific camelid single-domain antibody fragments. PLOS 1, 11 (3)

Ramos, O. H. P., y Selistre-de-Araujo, H. S. (2006). Snake venom metalloproteases-structure and function of catalytic and disintegrin domains. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology y Pharmacology, 142(3-4), 328-346.

Richard, G., Meyes, A., McLean, M., Arbabi-Ghagroudi, M., Mackenzie, R., y Hall, J. (2013). *In vivo* neutralization of alfa cobraatoxin with high affinity llama single domain antibodies (VHH) and a VHJH- Fc antibody. PO1, 8 (7) , e 69495.

Ries, J., Kaplan, C., Plantonova, E., Eghlidi, H., Ewes, H. (2012) A simple, versatile method for GFP-based super resolution microscopy via nanobodies. NM 9 (6), 582.

Rioux, V., Gerbod, M. C., Bouet, F., Ménez, A., y Galat, A. (1998). Divergent and common groups of proteins in glands of venomous snakes. *Electrophoresis*, 19(5), 788-796.

Rodríguez, E., y Yarlequé, A. (1991). Aislamiento y algunas propiedades de la proteinasa I del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. *Acta Cient Venez*, 42(4), 219-25.

Rodríguez, S., Negrin, A., y Burger, M. (2004). Efecto adverso por suero antiofídico. *Revista Médica del Uruguay*, 20(3), 228-232.

Rojas, E. E. G., dos Reis Coimbra, J. S., Minim, L. A., y Zúñiga, A. D. G. (2002). Proceso de purificación de las proteínas del lactosuero usando cromatografía por exclusión molecular. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, (339), 33-38.

Sabir, J., Atef, A., El Domyate, G., Edris, S., Harjah, N., Alzohairy, A., Bahieldin, A. (2014) Construction of naive camelids VHH repertoire in phage display based library *Comptes rendus biologies*, 337 (4) : 243-249.

Saldarriaga, M. M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M. F., Díaz, A., y Gutiérrez, J. M. (2003). Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon*, 42(4), 405-411.

Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (pp3. 17-3.32).

Sanchez, E. F., Freitas, T. V., Ferreira-Alves, D. L., Velarde, D. T., Diniz, M. R., Cordeiro, M. N. *et al.*, (1992). Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*, 30(1): 95-103.

Sanchez, E., Malaghaes, A., Mandelbaum, G., Diniz, C. (1991) Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). *BBA-GS*, 1074 (3): 347 – 356.

- Sanchez, E., Santos, C., Magalhaes, A., Diniz, C., Figueiredo, S., Gilroy, J., Richardson, M. (2000). Isolation of proteinase with plasminogen activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom. *ABB*, 378 (1) : 131-141.
- Sandhu, J. S. (1992). Protein engineering of antibodies. *Critical reviews in biotechnology*, 12(5-6), 437-462.
- Schneider, F. S., de Almeida Lima, S., de Ávila, G. R., Castro, K. L., Guerra-Duarte, C., Sanchez, E. F. *et al.*, (2016). Identification of protective B-cell epitopes of Atroxlysin-I: A metalloproteinase from *Bothrops atrox* snake venom. *Vaccine*, 34(14): 1680-1687.
- Schmidt, A., Kochanowski, K., Vedelaar, S., Ahn, E., Volkmer, B., Callipo, L. y Heinemann, M. (2016). The quantitative and condition-dependent *Escherichia coli* proteome. *Nature biotechnology*, 34(1), 104.
- Segura, A., Cartillo, M., Nuñez, V., Yarleque, A., Gonzalvez, L., Villalta, M., y Yano, M. (2010). Preclinical assessment of the neutrañozin capacity of antivenom produced in 6 countries of LA against venoms of Bothrops snake venoms. *Toxicon*, 56, 980-989.
- Selistre de Araujo, H., Cominetti, M., Terrugi, C., Mariano Oliveira, A., De Freitas, M., Crepin, M., Morandi, V. (2005). Alternagin – C, a desintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. *BJMBR*, 38 (10): 1505 – 1511.
- Sheets, R. (2000). History and characterization of the vero cell line. US Food and Drug Administration CfBEaR, ed. US Food and Drug Administration, Silver Spring, MD.
- Silverira, L., Marchi Salvador, D., Santos Filho, N., Silva, F., Marcussi, S., Fuly, A., Soares, A. (2013). Isolation and expression of a hypotensive and antiplatelet acidic PLA” from *Bothrops moojeni* snake venom. *JPBA*, 73 , 35 – 43.

- Singha, T. K., Gulati, P., Mohanty, A., Khasa, Y. P., Kapoor, R. K., y Kumar, S. (2017). Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. *Process Biochemistry*, 55, 17-31.
- Sockolosky, J. T., y Szoka, F. C. (2013). Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein expression and purification*, 87(2), 129-135.
- Sousa, L. F., Portes-Junior, J. A., Nicolau, C. A., Bernardoni, J. L., Nishiyama-Jr, M. Y., Amazonas, D. R. *et al.*, (2017). Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *Journal of Proteomics* 159: 32-46 .
- Stábeli, R. G., Sant'Ana, C. D., Ribeiro, P. H., Costa, T. R., Ticli, F. K., Pires, M. G., ... y Sampaio, S. V. (2007). Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. *International journal of biological macromolecules*, 41(2), 132-140.
- Stavnezer, J., y Amemiya, C. T. (2004, August). Evolution of isotype switching. In *Seminars in immunology* (Vol. 16, No. 4, pp. 257-275). Academic Press.
- Stetz, M. A., Carter, M. V., y Wand, A. J. (2016). Optimized expression and purification of biophysical quantities of the Lac repressor and Lac repressor regulatory domain. *Protein Expression and Purification*, 123, 75–82.
- Suntravat, M., Helmke, T., Atphaist, C., Cueva, E., Lucena, S., Uzcategui, N.,(2016) Expresion, purification and analysis of three recombinante ECD desintegrins from P III class snake venom metalloproteinases affecting platelet agregation and SK- MEL- 28 cell adhesión. *Toxicon*, 122 : 43-49.

Takahashi, T., Ohsaka, A. (1970). Purification and characterization of proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*: complete separation of hemorrhagic enzymes. *BBAE*, 198 (2): 293-307.

Theakston, R. D. G., y Reid, H. A. (1983). Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*, 61(6): 949.

Tillib, S. V. (2011). "Camel nanoantibody" is an efficient tool for research, diagnostics and therapy. *Molecular biology*, 45(1), 66-73.

Viala, V. L., Hildebrand, D., Fucase, T. M., Sciani, J. M., Prezotto-Neto, J. P., Riedner, M., y Schlüter, H. (2015). Proteomic analysis of the rare Uracoan rattlesnake *Crotalus vegrandis* venom: evidence of a broad arsenal of toxins. *Toxicon*, 107, 234-251.

Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S., y Conrath, K. (2009). General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5): 3273-3284.

Vivas, D., Inga, R., y Yarlequé, A. (2012). Uso potencial de componentes del veneno de serpiente en el tratamiento del cáncer. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública*, 29(3): 396-401.

Vu, K. B., Ghahroudi, M. A., Wyns, L., y Muyldermans, S. (1997). Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Molecular immunology*, 34(16-17), 1121-1131.

Wagstaff, S., Harrison, R (2006). Venom gland EST analysis of the saw-scaled viper *Echis ocellatus*, reveals novel alpha9 beta1 integrin binding motifs in venom metalloproteinases and new group of putative toxins, *Gene*, 377, 20-31.

Warburg, O., y Christian, W. (1941). Isolierung und kristallisation des grungsferments enolase. *Naturwissenschaften*, 29(39), 589-590.

Wilson, D. Hogness, D. (1964) the enzyme of the galactose operon in *E. coli*. Purification and characterization of uridine diphogalatose 4- epimerase. *JBC*, 139 (8) 1469-1482.

Woolven, B. P., Frenken, L. G., van der Logt, P., y Nicholls, P. J. (1999). The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics*, 50(1), 98-101.

World Health Organization. (2007). Rabies ad envenomin: a neglected public healtg. Report of consultative meeting. WHO, Geneva, 10/01/2007. In rabies and envenoming.

Yardehnavi, N., Behdani, M., Pooshang Bagheri, K., Mahmoodzadeh, A., Khanahmad, H., Shahbazzadeh, D., y Muyldermans, S. (2014). A camelid antibody candidate for development of a therapeutic agent against *Hemiscorpius lepturus* envenomation. *The Faseb Journal*, 28(9), 4004-4014.

Yarleque, A., Viva, D., inga, R., Rodriguez, E., Sandoval, G., Pessa, S., y Bonilla, C. (2008) acci3n del antiveneno botropico polivalente sobre actividades proteol3ticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. *RPMESSP.*, 25(2): 169-172.

You, W., Chow, W., Koh, Y., Shin, H., Jang, Y. (2004) Functional characterization of recombinant batroxobin a snake venom expressed from *P. pastoris*. *Journal FEEB*, 571 (1-3); 67-73

Zhang, Z., Gildersleeve, J., Yang, Y. Y., Xu, R., Loo, J. A., Uryu, S., y Schultz, P. G. (2004). A new strategy for the synthesis of glycoproteins. *Science*, 303(5656), 371-373.

Zelanis, A., y Tashima, A. K. (2014). Unraveling snake venom complexity with ‘omics’ approaches: challenges and perspectives. *Toxicon*, 87: 131-134.

Zigrino, P. Kamiguti, A., Eble, J. (2002) thereplotilisin jararhagin a snake venom SVMP, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. JBC, 277 (43): 428-435.

Zou, X., Smith, J., Nguyen, V., (2005) Expression of a dromedary heavy chain-only antibody and B. cell development in the mouse. TJI. 175 (6). 3769-3779.

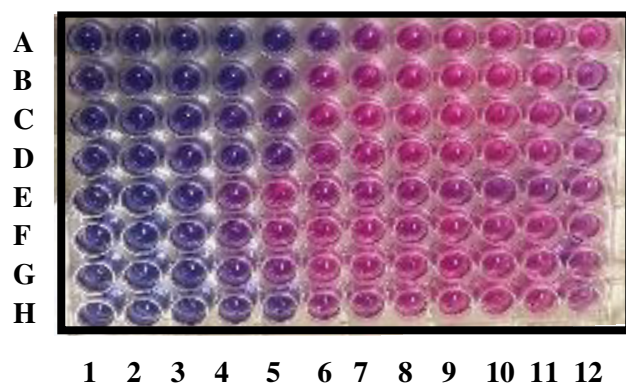
XI. ANEXO

Tabla A1. Esquema de las concentraciones de de color gris oscuro (■, Filas A-D)

fueron usadas con el veneno total de *B. atrox* mientras que gris claro (□, Filas E-H)

fueron usadas con una fracción hemorrágica pesada.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	380.95	190.48	95.24	47.62	23.81	11.90	5.95	2.98	1.49	0.74	C-	B
B	380.95	190.48	95.24	47.62	23.81	11.90	5.95	2.98	1.49	0.74	C-	B
C	380.95	190.48	95.24	47.62	23.81	11.90	5.95	2.98	1.49	0.74	C-	B
D	380.95	190.48	95.24	47.62	23.81	11.90	5.95	2.98	1.49	0.74	C-	B
E	380.95	190.48	95.24	47.62	23.81	11.90	5.95	2.98	1.49	0.74	C-	B
F	380.95	190.48	95.24	47.62	23.81	11.90	5.95	2.98	1.49	0.74	C-	B
G	380.95	190.48	95.24	47.62	23.81	11.90	5.95	2.98	1.49	0.74	C-	B
H	380.95	190.48	95.24	47.62	23.81	11.90	5.95	2.98	1.49	0.74	C-	B



Soluciones y buffers

Tabla A2. Componentes de PAGE-SDS al 15 y 12 %

REACTIVO	Gel separador 15%/12 % (<i>Resolución</i>)	Gel concentrador 5% (<i>empacamiento</i>)
Agua destilada (mL)	2.3/3.3	2.7
Acrilamida 30%	5/4 mL	670 µL
Buffer del gel (1 M pH 8.8*/0.5 M pH 6.8**)	2.5 mL	500 µL
SDS 10% (µL)	100	40
APS 10% (µL)	100	40
TEMED (µL)	10	4
Total (mL)	10	4

*buffer para gel *resolución* y **buffer para gel *de empacamiento*

Tabla A3. Componentes de buffer Tris-glicina (Buffer de corrida)

Reactivos	Peso (g)	Concentración final
Tris base	3.038	25 mM
Glicina	15.01	200 mM
SDS	1	0.1 %

*Completar hasta 1 L de agua destilada

Tabla A4. Componentes de la solución de trabajo acrilamida/bisacrilamida 30%

Reactivos	Peso (g)	Concentración final
Acrilamida	29.2	29.2 %
Bisacrilamida	0.8	0.8 %
Mezcla total	30	30 %

*Completar hasta 100 mL de agua destilada, filtrar y almacenar refrigerado y en oscuridad.

Terrific Broth (TB) (Tartof y Hobbs, 1987)

Disolver 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura y 4 mL de glicerol en 900 mL de agua destilada y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq en ciclo líquido. Permitir que la solución enfrié hasta 60 °C o menos y luego añadir 100 mL de una solución estéril de KH_2PO_4 al 0.17 M, K_2HPO_4 al 0.72 M.

Ampicilina (100 mg/mL)

En un frasco llenar 30 mL de etanol al 70% Pesar 5 g de ampicilina y diluir en el frasco con alcohol. Llevar a 50 mL con etanol 70%. Esterilizar por filtración en membrana con poro 0.22 micras. Alicuotar y almacenar a -20 °C.

Glucosa al 20% (100 mL)

En un frasco llenar 70 mL de agua destilada. Pesar 20 g glucosa y diluir en el frasco con agua destilada. Llevar a 100 mL con agua destilada. Esterilizar en autoclave por 20 minutos a 15 lb/sq en ciclo líquido y almacenar a temperatura ambiente en un lugar seco y bien sellado.

MgCl₂ al 2 M (50 mL)

Disolver 20.33 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 40 mL de agua destilada, luego ajustar hasta 50 mL de volumen con agua destilada. Autoclavar o filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

Isopropil-B-Dthiogalatosiida (IPTG) 1 M (50 mL)

Disolver 11.92 g de IPTG en 40 mL de agua destilada, luego ajustar hasta 50 mL de volumen con agua destilada. Esterilizar por filtración y almacenar a temperatura ambiente. Almacenar a -20 °C en alícuotas de 1 mL

EDTA 100 mM (50 mL)

Disolver 1.86 g EDTA en 40 mL de agua destilada, luego ajustar hasta 50 mL de volumen con agua destilada. Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

Tris-HCl pH 8.0 1 M (1 L)

Disolver 121.1 g de Tris base en 900 mL de agua destilada, luego ajustar pH 8 con HCl y llevar el volumen hasta 1 L de volumen con agua destilada. Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente. Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

TES (1 L)

Disolver 171.15 g de sacarosa, 200 mL Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 5 mL de 100 mM de EDTA en 700 mL de agua destilada y ajustar el volumen a 1 L. Esterilizar por filtración con filtros de 0.22 micras. Almacenar a 4 °C

TES/4

Mezclar 1 volumen de TES con 3 volúmenes de agua destilada estéril y almacenar a 4 °C

Determinación de la viabilidad celular

Se graficó el porcentaje de viabilidad celular versus el logaritmo de la concentración final de veneno usado. Para determinar el porcentaje de viabilidad celular se usó la fórmula:

$$\% \text{viabilidad celular} = \frac{(O_2 \times A_1) - (O_1 \times A_2)}{(O_2 \times P_1) - (O_1 \times P_2)} \times 100$$

O_1 = Coeficiente de extinción molar (E) del Alamarblue oxidado (azul) a 570 nm

O_2 = Coeficiente de extinción molar (E) del Alamarblue oxidado a 600 nm

A_1 =Absorbancia de pocillos de test a 570 nm

A_2 = Absorbancia de pocillos de test a 600 nm

P_1 = Absorbancia de pocillos control de crecimiento positivo (blanco) a 570 nm

P_2 = Absorbancia de pocillos control de crecimiento positivo (blanco) a 600 nm

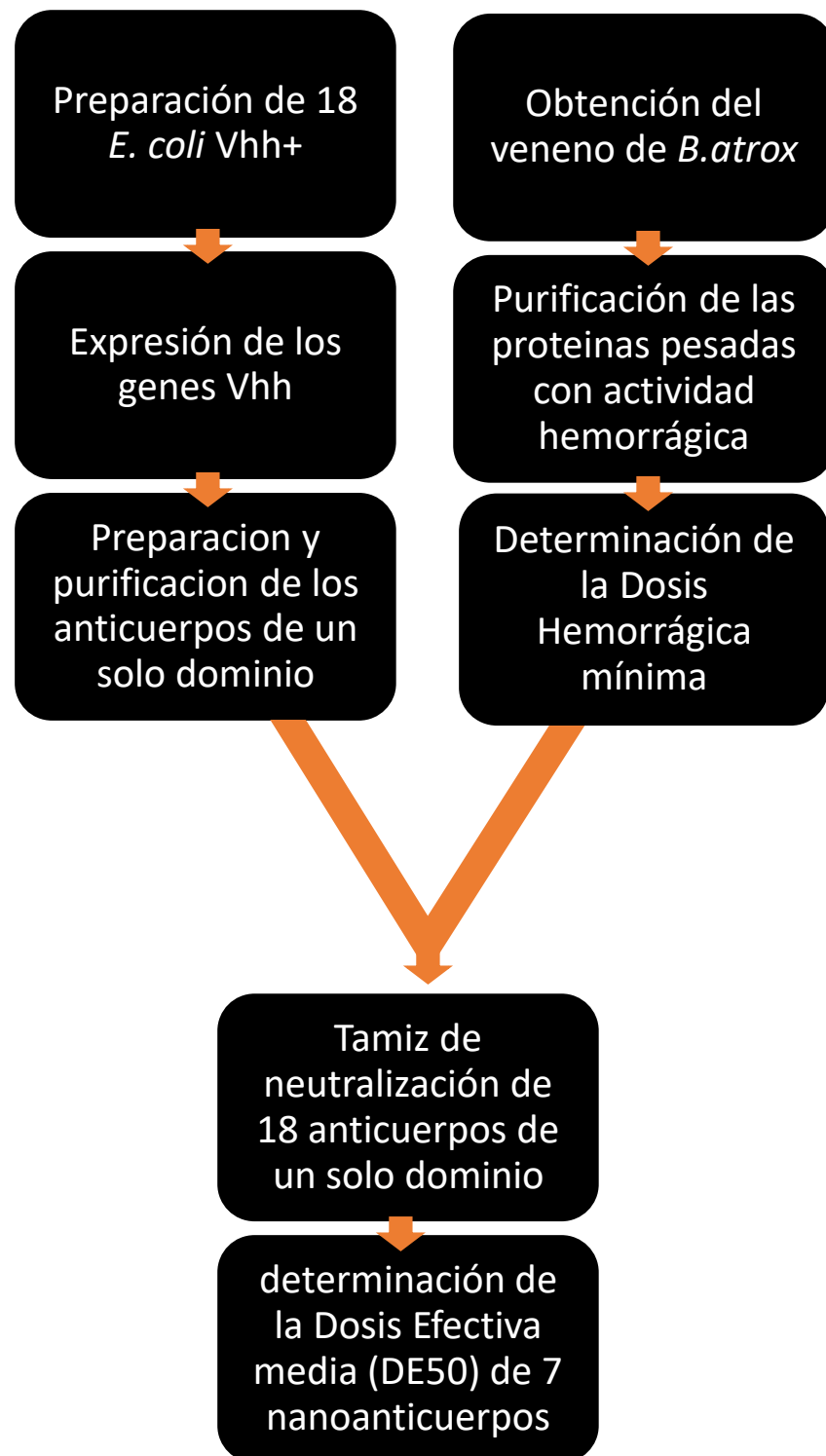
Tabla A5. Coeficiente de extinción molar de resazurina.

λ	(R)*	(E)**
570	155.677	80.586
600	14.652	117.216

* Coeficiente de extinción molar (E) del Alamarblue reducido

** Coeficiente de extinción molar (E) del Alamarblue oxidado

Figura A1. Flujo de trabajo para la determinar la neutralización de los anticuerpos de un solo dominio sobre el efecto hemorrágico del veneno de *B. atrox*.



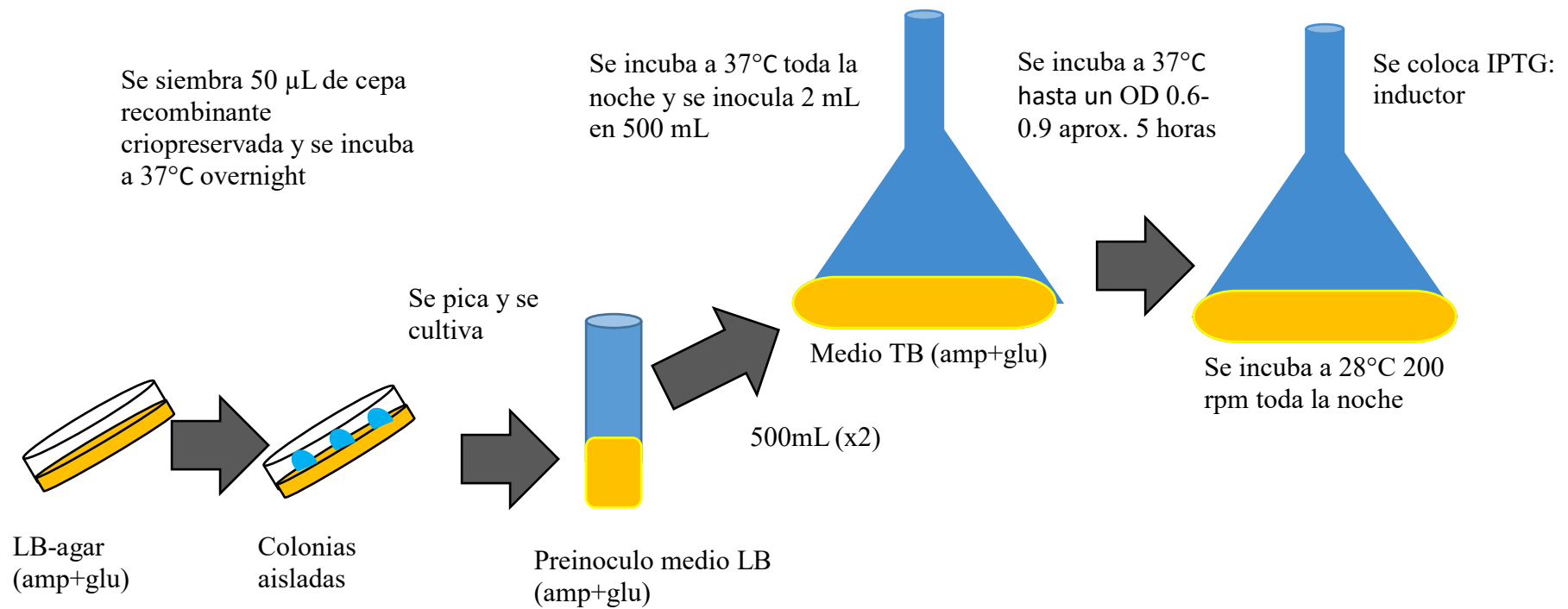


Figura A2. Esquema de la inducción y expresión de anticuerpos recombinantes de un solo dominio

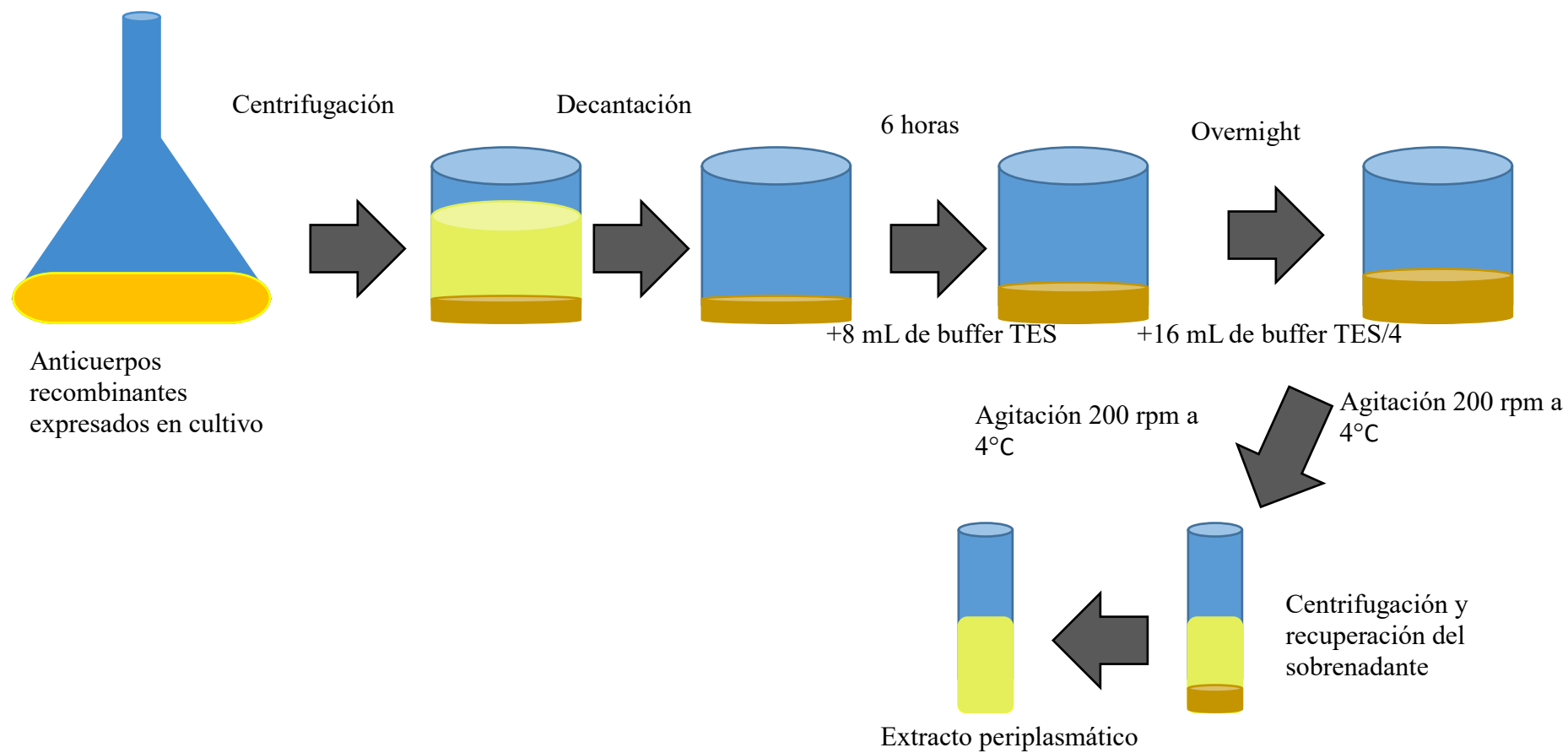


Figura A3. Esquema de obtención del extracto periplasmático a partir del cultivo de *E. coli* VHH+ inducido.

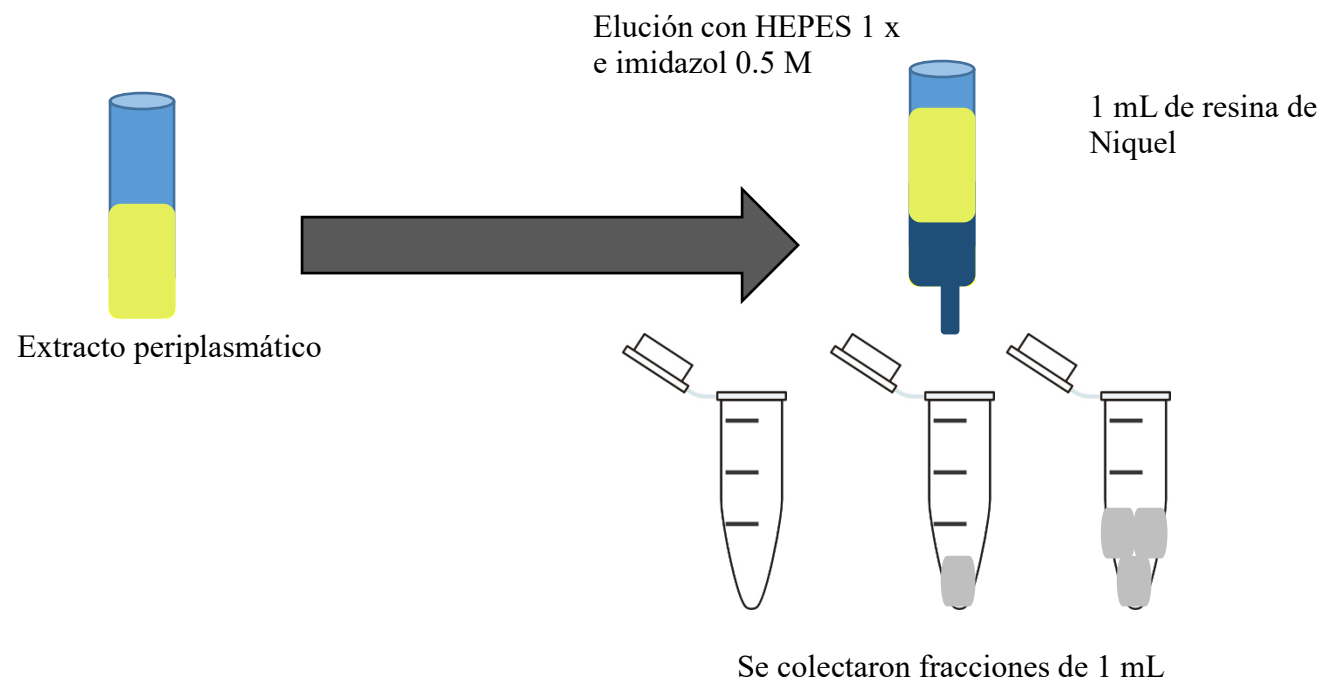


Figura A4. Esquema de la purificación de nanoanticuerpo

Buffer: acetato de
amonio pH 0.5 a 0.1 M

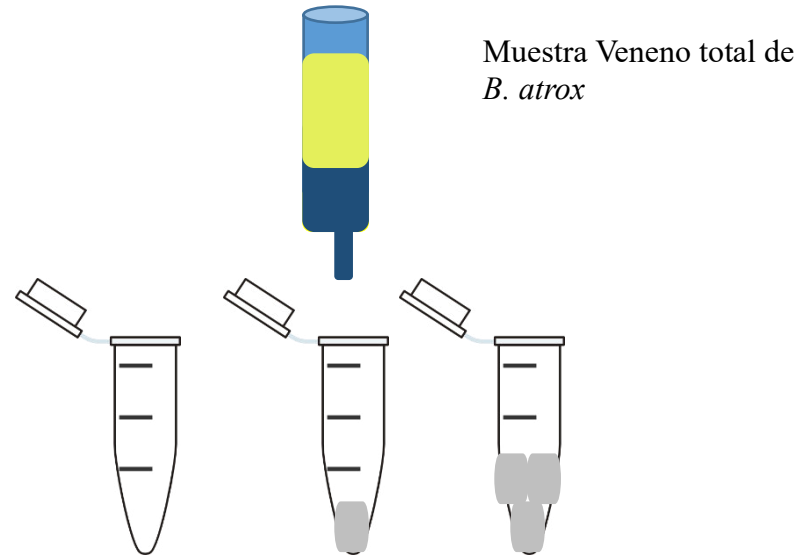
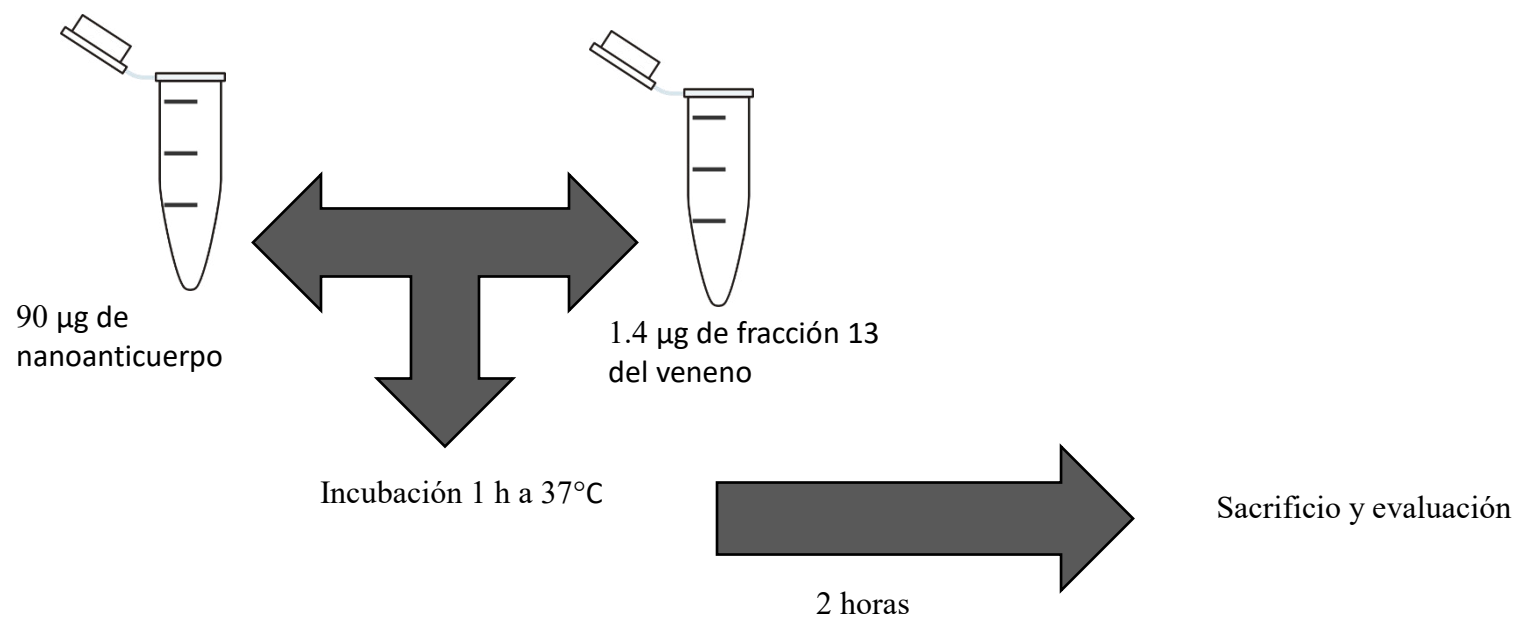


Figura A5. Esquema de la purificación de veneno de *B. atrox* sobre Sephadex G-100

Figura A6. Actividad hemorrágica del veneno de *B. atrox* en ratones por vía intradérmica y evaluación del halo hemorrágico después de dos horas



Figura A7. Tamiz de neutralización de actividad hemorrágica (fracción hemorrágica) de los anticuerpos de un solo dominio.



Inoculación vía intradérmica (i.d.)
Se emplearon los lineamientos establecidos por Kondo et al. (1960)

Figura A8. Especies animales utilizadas en el estudio, *Bothrops atrox* y *Lama glama*.



Figura tomada de la página oficial de The reptile database
Pag: <http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=atrox>



Llama del Instituto Nacional de Salud, 2017